Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Hals-, Nasen- und Ohrenkranke Würzburg
Direktor: Prof. Dr. W. Kley

IN-VITRO WACHSTUM VON MALIGNEN TUMOREN DES KOPF- UND HALSBEREICHS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Armin Stremlau
aus Würzburg

Würzburg, den 23. November 1981

1982

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Hals-, Nasen- und Ohrenkranke Würzburg
Direktor: Prof. Dr. W. Kley

IN-VITRO WACHSTUM VON MALIGNEN TUMOREN DES KOPF- UND HALSBEREICHS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Armin Stremlau
aus Würzburg

Würzburg, den 23. November 1981

Referent:	Prof. Dr. med. I. F. Herrmann
Korreferent:	Prof. Dr. med. W. Kley
Dekan:	Prof. Dr. med. K. A. Busche

Tag der mündlichen Prüfung: 28.Juli 1982

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	**EINLEITUNG**	1
2	**GESCHICHTLICHES**	3
3	**MATERIAL**	5
3.1	Geräte für die Zellkultur	5
3.2	Zellkulturartikel	5
3.3	Kulturmedien und Biochemikalien	6
3.4	Sterilisation	6
4	**METHODEN**	7
4.1	Allgemeines zur Primärkultur	7
4.2	Arbeiten mit der Zellkultur	7
4.3	Kulturmedien	8
4.3.1	Konditioniertes Medium	9
4.4	Füttern	10
4.5	Umsetzen	11
4.6	Anlegen einer Primärkultur	12
4.6.1	Mechanisches Zerlegen des Tumorgewebes	13
4.6.2	Andauung des Tumorgewebes mit Trypsin	13
4.6.3	Andauung des Tumorgewebes mit Kollagenase	14
4.6.4	Ansetzen einer tumorösen Punktionsflüssigkeit	14
4.7	Zellarten in der Primärkultur	14
4.8	Entfernung der Fibrozyten aus der Kultur	16
4.8.1	Mechanisches Entfernen der Fibrozyten	16
4.8.2	Entfernung der Fibrozyten durch Trypsinieren	17
4.8.3	Anlage einer Sekundärkultur	17
4.9	Klonierung	18
4.9.1	Klonierung mit der Kapillarmethode	18
4.9.2	Klonierung mit Cuprakschalen	19

4.10	Transplantation von Epithelzellen auf eine thymusaplastische (nu/nu) Maus	19
4.11	Einfrieren	19
5	DARLEGUNG DER ARBEITSERGEBNISSE	21
5.1	Histologie und Topik der angesetzten Tumore	21
5.1.1	Karzinome	21
5.1.2	Melanom	22
5.1.3	Sarkome	22
5.1.4	Neurinome	22
5.1.5	Sonstiges	22
5.2	Zahl der Primärkulturen	22
5.3	Wachstumsverhalten der Primärkulturen	23
5.3.1	Zeitraum zwischen dem Ansetzen und dem Auswachsen der ersten Epithelzellen	23
5.3.2	Lebensdauer der Epithelzellen in der Kultur	23
5.3.3	Subkultivierung	25
5.4	Einfluß der Primärkulturtechnik auf das Auswachsen epithelialer Zellen	30
5.5	Einfluß verschiedener Kulturmedien auf das Auswachsen epithelialer Zellen	31
5.6	Mischwachstum von Epithelzellen und Fibrozyten	31
5.6.1	Degeneration epithelialer Klone ohne Fibrozytenkontakt	32
5.6.2	Degeneration epithelialer Klone nach Fibrozytenkontakt	34
5.6.3	Degeneration epithelialer Klone nach Fibrozyteninfiltration	34
5.6.4	Verdrängung von Epithelzellen durch Fibrozyten	35
5.7	Etablierte Zellinien	36
5.7.1	Etablierung der Melanomzellinie (HMe 78)	36

Seite

5.7.1.1 Klonierung der Melanomzellinie 40
5.7.1.2 Melaninnachweis 40
5.7.1.3 Transplantation auf (nu/nu) Mäuse 40
5.7.2 Etablierung der Larynxkarzinomzellinie (HLaC 79) 41
5.7.2.1 Klonierung der Larynxkarzinomzellinie 44
5.7.2.2 Transplantation auf (nu/nu) Mäuse 44
5.7.3 Etablierung der Parotiskarzinomzellinie ($HPaC^+$ 79) 45
5.7.3.1 Klonierungsversuch 48
5.7.3.2 Transplantation auf (nu/nu) Mäuse 49
5.8 Chromosomenanalyse der Melanomzellinie HMe 78 und der Larynxkarzinomzellinie HLaC 79 49

6 **DISKUSSION** 56

7 **ZUSAMMENFASSUNG** 67

8 **LITERATURVERZEICHNIS** 69

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0068

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

1 EINLEITUNG

Viele Untersuchungsmethoden von Kopf- und Halstumoren, insbesondere biochemische, immunologische und virologische Verfahren, sind nur mit Hilfe großer Mengen reiner Tumorzellen möglich (47).

Aus soliden Tumoren kann man mit physiko-chemischen Verfahren zwar Tumorzellen hoch anreichern, eine reine Tumorzellpräparation ist jedoch nicht zu erreichen (47).

Mit der Zellkultur kann man Tumorzellen in fast beliebiger Menge züchten (4,7). Bis heute wurden elf Zellinien etabliert, die sich von menschlichen Hals- und Kopftumoren ableiten (4,7); die jüngste Linie wurde vor acht Jahren, die älteste vor 28 Jahren angezüchtet. Nur noch zwei dieser Linien standen jedoch zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung, die Larynxkarzinomzellinie HEp2 (27) und die Mundkarzinomzellinie KB (10). Beide Zellinien müssen aber mit fremden Zellen kontaminiert sein, wahrscheinlich mit HeLa-Zellen. Sie enthalten nämlich das Isoenzym A der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, das nur in der schwarzen Bevölkerung auftritt. Die Linien entstammen hingegen von weißen Patienten (13). Sie sind also nicht mehr für Untersuchungsverfahren über Hals- und Kopftumoren geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Malignome aus dem HNO-Bereich in der Zellkultur angesetzt, um neue, reine Tumorzellinien zu etablieren. Der Beweis der Malignität der gezüchteten Zellen wurde durch Klonierung und

nachfolgende Transplantationsexperimente auf thymus-aplastische (nu/nu) Mäuse erbracht.

2 GESCHICHTLICHES

Die Zellkultur entwickelte sich aus Techniken, die die Embryologie im letzten Jahrhundert benutzte.

1885 bewahrte Wilhelm ROUX die Medullar-Scheibe eines Hühnerembryos einige Tage in warmer Salzlösung auf; dies ist als erster, erfolgreicher Fall einer Transplantation in die Literatur eingegangen (37).

1906 folgte die erste Veröffentlichung über die Kultivation eines Malignoms. BEEBE und EWING beschrieben die Züchtung eines infektiösen Hundelymphosarkoms im Blut von resistenten und empfänglichen Tieren (2).

Diese Experimente nahmen Techniken um 30 oder 40 Jahre vorweg, die heute allgemein benützt werden. In dieser Zeit war es schwierig, sie zu wiederholen und es gab immer Zweifel, ob die Versuche echtes Weiterleben von gesundem Gewebe zeigten oder lediglich verzögerten Zelltod. Erst Ross HARRISON'S Experiment im Jahre 1907 bewies ganz eindeutig eine Fortsetzung normaler Zellfunktion in vitro (18). Er explantierte kleine Gewebsstücke aus der Mark-Gefäßgegend von Froschembryonen in Gerinnsel von Froschlymphe. Die Stückchen überlebten und Axonen wuchsen aus den Zellen aus. Deshalb wird heute das Jahr 1907 allgemein als der eigentliche Beginn der Gewebekultur angesehen (33).

Die größte Schwierigkeit war damals die Vermeidung bakterieller Kontamination. Alexis CARREL wandte als

erster konsequent die aseptischen Techniken der Chirurgie in der Zellkultur an (6). Eine Glanzleistung war es, eine Zellinie ohne Benutzung von Antibiotika 34 Jahre lang in aktiver Vermehrung zu halten. Dies zeigte, daß man Zellen in vitro voraussichtlich unbegrenzt züchten kann.

Eine Transplantation auf eine xenogene Tierart führte zuerst MURPHY 1912 erfolgreich aus. Er verpflanzte Chorioallantois-Membranen in Nagetiere, die er vorher mit Röntgenstrahlen behandelt hatte, um die Wirtsreaktion zu unterdrücken (29). TOOLAN führte zum selben Zweck 1954 den Gebrauch von Cortison ein (42).
1966 und 1968 beschrieben FLANAGAN (11) bzw. PANTELOURIS (31) eine Mäusemutante (nu/nu mice), die infolge eines rezessiv vererbbaren Gendefektes eine angeborene Thymusaplasie aufweist. Die dadurch verursachte Schädigung der zellulären Immunabwehr begünstigt ein Anwachsen heterologer Gewebe, vorzugsweise maligner Geschwülste (25).

3 MATERIAL

3.1 Geräte für die Zellkultur

Folgende Geräte wurden für die Zellkultur verwandt:

Ein Laminar Air Flow (Flow Laboratories GmbH),
zwei Brutschränke mit CO_2-Begasung (Forma Scientific),
ein Umkehrmikroskop mit Fotoansatz (Leitz),
eine Zentrifuge (Hettich Rotixa),
ein Flüssig-Stickstoff-Kühlgerät (Union Carbide)

und eine Feinwaage, ein Kühlschrank, ein Pipettenspüler, zwei Wasserbäder.

3.2 Zellkulturartikel

Folgende Zellkulturartikel wurden eingesetzt:

Zellkulturflaschen, steril, aus Polysterol (25 und 75cm^2) von Corning,
Zellkulturpetrischalen (35, 60 und 100 mm Ø) von Falcon,
Cuprakschalen (60 x 15 mm) von Costar,
Sterile Einmalfilter (150 ml; 0,22 Micron) von Falcon,
Kryoröhrchen (steril) von Nunc sowie
Gewebekulturflaschen aus Glas (Roux) von Schott.

3.3 Kulturmedien und Biochemikalien

Von Böhringer (Mannheim) wurde bezogen:

Synthetische Kulturmedien,
Fötales Kälberserum,
L-Glutamin (200 mmol/l) sowie
EDTA 0,02 % in PBS.

Seromed (München) lieferte Penicillin/Streptomycin (10.000 U/10.000 ng/ml).

Trypsin (2,5 %) wurde von Gibco (Europe) hergestellt.

3.4 Sterilisation

Hitzestabiles Material wird im Autoklaven der Zentralsterilisation in gesättigtem, gespannten Dampf bei 134 °C und 2,5 atü Druck mindestens fünfzehn Minuten lang behandelt.

Thermolabile Materialien werden einem Gasgemisch von 15 % Äthylenoxid und 85 % CO ausgesetzt. Bei einem Druck von 5,8 atü und einer Temperatur von 55 °C dauert der Sterilisationsvorgang drei Stunden. Damit sich Reste von Äthylenoxid in den behandelten Materialien verflüchtigen können, wurden die Materialien frühestens zwei Wochen nach der Sterilisation in der Zellkultur eingesetzt.

4 METHODEN

4.1 Allgemeines zur Primärkultur

Bei Anlage einer Primärkultur wird Tumorgewebe mechanisch oder enzymatisch zerlegt und die Gewebsstückchen und gelösten Zellen in einem entsprechenden Medium auf einer entsprechenden Unterlage zum Aufwachsen und zur Vermehrung gebracht.

Die meisten Primärkulturen vermehren sich nach einer sehr raschen Anfangsphase langsamer weiter, beenden schließlich ihr Wachstum und sterben aus. Die Anfangsphase des schnellen Wachstums kann nur einige Tage dauern, aber auch einige Monate währen.

Gelingt es, die Primärkultur umzusetzen, d. h. von der Oberfläche abzulösen und nach Verdünnen neu auszusäen, woraufhin die Zellen weiterwachsen, so spricht man von einer Primärzellinie.

Man kann einige Zellinien solange züchten, bis sie scheinbar die Fähigkeit entwickelt haben, in vitro unbegrenzt weiterzuwachsen. Solche Zellinien nennt man etablierte (permanente) Zellinien. Als allgemeine Regel gilt, daß eine Linie erst als etabliert bezeichnet werden darf, wenn sie mindestens 70 mal passagiert wurde, mit einem Zeitraum von mindestens drei Tagen zwischen jeder Passage (33).

Der beste und sicherste Weg, eine reine Zellinie zu

erhalten, ist die Zucht der Linie aus einer einzigen Zelle. Das nennt man Zellklonierung. Es ist nicht sicher, daß die Nachkommen genetisch homogen bleiben, aber alle Zellen sind vom selben Allgemeintyp.

4.2 Arbeiten mit der Zellkultur

Die Kulturen werden in einem Brutschrank in feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 7,5 % CO_2 gezüchtet.

Alle Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

Die Kulturmedien und Biochemikalien, die auf die Kultur pipettiert werden, werden vorher auf 37 °C erwärmt.

Müssen die Zellen zentrifugiert werden, so werden sie zehn Minuten lang mit nicht mehr als 1000 U.p.m. zentrifugiert.

4.3 Kulturmedien

Das Kulturmedium ist bei weitem das wichtigste Faktorensystem bei der Züchtung von Zellen und Geweben.

Die Aufgabe des Kulturmediums besteht darin, erstens die zum Weiterleben erforderlichen, physikalischen Verhältnisse des pH-Wertes, osmotischen Druckes u.s.w. zu schaffen, und zweitens die komplizierten chemischen Substanzen bereitzustellen, die die Gewebe brauchen, selber

aber nicht herstellen können. Darunter fallen: Aminosäuren, Kohlenhydrate und Vitamine (33).

Man kann Gewebekulturmedien verwenden, die aus natürlichen Quellen gewonnen wurden. Da ihre Zusammensetzung aber unbekannt und variabel ist, ist es unmöglich, gleiche Bedingungen exakt zu reproduzieren. Deshalb wurden nur synthetische Kulturmedien verwandt, die aus genau definierten Bestandteilen zusammengesetzt sind. Diese Medien wurden durch fötales Kälberserum komplettiert.

Es wurde mit neun verschiedenen Kulturmedien gearbeitet:

Basal Medium Eagle (BME) mit Earle's Salzen,
Basal Medium Eagle (BME) mit Hank's Salzen,
Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen,
Minimum Essential Medium (MEM) mit Hank's Salzen,
Minimum Essential Medium (MEM), Dulbecco's Modification,
Medium RPMJ 1640,
Medium 199 mit Earle's Salzen,
Medium L 15 (Leibovitz) sowie
Mc Coys 5a Medium.

Alle Kulturmedien waren mit fötalem Kälberserum (20 ml/100 ml) und Penicillin/Streptomycin (5 ml/100 ml) angereichert. Den Medien MEM (Earle), MEM (Hank) und MEM (Dulbecco) wurde noch L-Glutamin (5 ml/100 ml) zugegeben.

4.3.1 Konditioniertes Medium

In einer größeren Kultur helfen sich die Zellen mit Nähr-

stoff- und Wuchsfaktorenaustausch gegenseitig. Dagegen ist in einer Kultur mit nur wenigen Zellen die Einzelzelle auf sich alleine angewiesen. Man kann den Zellen helfen, wenn man ein Medium verwendet, in dem vorher schon eine größere Zellkultur, wenn möglich der gleichen Zellen, gewachsen ist. Ein derartiges Medium nennt man konditioniert.

Man nimmt ein Medium, in dem eine Zellkultur zwei Tage gewachsen ist, filtriert es steril und mischt es mit frischem Medium (1:1).

4.4 Füttern

Eine der wichtigsten Aufgaben oder Voraussetzungen für den Ablauf der Lebensvorgänge und den Bestand des Lebens ist es, eine Konstanz der Lebensbedingungen zu schaffen.

Regelungsvorgänge, wie sie im Organismus ablaufen, sind in der Kultur nicht möglich. Deshalb muß das Kulturmedium immer wieder durch frisches Medium ersetzt werden, damit eine möglichst gleichbleibende Konzentration der Ausgangsprodukte gewährleistet ist und jede Anhäufung stickstoffhaltiger Stoffwechselprodukte oder von Kohlensäure verhindert wird.

Im Kulturmedium sammeln sich aber nicht nur schädliche Stoffwechselprodukte an, sondern die Zellen geben auch Nährstoffe und Wuchsfaktoren ans Medium ab und helfen sich so gegenseitig. Besonders Primärkulturen, die noch nicht lange in Kultur sind und sich noch nicht an die

neue Umgebung adaptiert haben, wie auch Kulturen mit sehr geringer Zellzahl, sind auf diese Stoffe angewiesen.

Primärkulturen werden je nach Zahl der Zellen, die ausgewachsen sind, erstmals nach sechs, neun oder zwölf Tagen gefüttert. Das Kulturmedium wird zur Hälfte abgesaugt und durch frisches ergänzt.
Je nach Wachstum der Zellen wird dann alle drei bis sechs Tage das Kulturmedium erneuert.

Bei etablierten Zellkulturen und Zellinien, die schon lange in Kultur sind, wird das Medium alle drei Tage gewechselt. Bei der Zellklonierung wird mit konditioniertem Medium gearbeitet. Das Medium wird alle sechs Tage ausgetauscht.

4.5 Umsetzen

Allgemein
Das alte Medium wird abpipettiert und die Kultur mit EDTA gespült, um einen trypsinaktivierenden Faktor zu entfernen, der aus dem Medium stammt. Dann wird eine Trypsinlösung auf den Zellrasen pipettiert und das Kulturgefäß geschwenkt, damit die Zellen gleichmäßig benetzt werden. Hierauf wird der größte Teil der Trypsinlösung wieder abgesaugt, so daß die Zellen gerade noch benetzt bleiben. Man läßt das Trypsin wenige Minuten einwirken und beobachtet das Ablösen der Zellen. Haben sich alle Zellen gelöst, wird Medium einpipettiert, um die Trypsinwirkung zu beenden. Die Zellsuspension wird verdünnt

und ausgesät.

Umsetzen einer Primärkultur oder einer jungen Zellinie
Man verwendet 0,25 %ige Trypsinlösung und beendet die Wirkung spätestens nach fünf Minuten, auch wenn sich nicht alle Zellen gelöst haben. Die Zellsuspension wird auf eine Konzentration von 10^5 Zellen/ml verdünnt.

Umsetzen einer etablierten Zellinie
Eine etablierte Zellinie sollte jede Woche einmal umgesetzt werden. Man kann 1 %ige Trypsinlösung verwenden und bis zu 15 Minuten einwirken lassen.
Die Zellsuspension sollte eine Konzentration von 10^3 Zellen/ml nicht unterschreiten.

4.6 Anlage einer Primärkultur

Das Tumorgewebe wurde in der Würzburger Universitätsklinik für HNO-Kranke chirurgisch gewonnen und steril in ein Kulturgefäß mit Medium gegeben. Unverzüglich wurde das Gewebe in das Zellkulturlaboratorium der Klinik gebracht und dort präpariert.

Zuerst muß alles nekrotische und avitale Material entfernt werden. Dann wird eine Zellsuspension hergestellt, indem das Tumorgewebe mechanisch oder enzymatisch zerlegt wird. Diese Zellsuspension wird mit verschiedenen Kulturmedien auf eine Konzentration von 10^4 Zellen/ml verdünnt, in Petrischalen gegeben und inkubiert (37 °C, 7,5 % CO_2). Alle drei Tage werden die Schalen unter dem Mikroskop daraufhin untersucht, ob Zellen ausgewachsen

sind. Je nach Wachstum wird erstmals nach einer Woche gefüttert. Das alte Medium wird nicht verworfen, sondern in ein Kulturgefäß gegeben und inkubiert, da oft noch Zellen auswachsen. Die Schalen werden sehr vorsichtig und möglichst selten bewegt, um jede unnötige Erschütterung zu vermeiden, die die Zellen am Auswachsen behindert. Wird die Kultur zu oft gestört, degenerieren die Zellen und lösen sich ab.

Sind nach drei Wochen noch keine Zellen ausgewachsen, wird die Kultur verworfen.

4.6.1 Mechanisches Zerlegen des Tumorgewebes

Das Gewebe wird in eine Schale mit Kulturmedium gelegt und mit einem frischen Skalpell durch schnelle, senkrechte Schnitte in Scheibchen zerteilt. Dabei lösen sich viele Einzelzellen und Zellklumpen mit drei bis zehn Zellen. Man verdünnt die Zellen, gibt sie zusammen mit den Gewebescheibchen in Kulturgefäße und inkubiert sie.

4.6.2 Andauung des Tumorgewebes mit Trypsin

Man gibt das Gewebe in eine Schale, die mit einer 0,25%-igen Trypsinlösung gefüllt ist und inkubiert es eine Stunde lang bei 37 °C. Dann wird das Gewebe durch Pipettieren weiter zerteilt, das Trypsin mit den gelösten Zellen aufgesaugt und die Zellen abzentrifugiert. Man verdünnt die Zellen mit Kulturmedium, sät sie in Kulturgefäße aus und inkubiert sie.

4.6.3 Andauung des Tumorgewebes mit Kollagenase

Man gibt das Gewebe in eine Schale, die mit 5 ml Kulturmedium gefüllt ist (MEM Earles mit 5 % fötalem Kälberserum), dem man 5 mg Kollagenase zugegeben hat. Nach 20 Stunden bei 37 °C wird das Medium mit den gelösten Zellen aufgesaugt, die Zellen werden abzentrifugiert und verdünnt. Dann werden sie in Kulturgefäße ausgesät und inkubiert.

4.6.4 Ansetzen einer tumorösen Punktionsflüssigkeit

In einem Fall wurde Punktionsflüssigkeit aus einer tumorösen Zyste angesetzt. Die Zellkonzentration in der Flüssigkeit wurde bestimmt, die Zellen mit Kulturmedium auf eine Konzentration von 10^4 Zellen/ml verdünnt, in Kulturgefäße ausgesät und inkubiert.

4.7 Zellarten in der Primärkultur

Tumorgewebe ist recht kompliziert zusammengesetzt und kann neben Tumorzellen auch Bindegewebszellen, eine Vielzahl von Zellen in den Blutgefäßen und retikulo-endotheliale Zellen enthalten.

So wachsen in einer Primärkultur neben den Tumorzellen noch Fibrozyten, mesothelähnliche Zellen und viele andere Zellen aus, die erst zum Teil identifiziert sind (5). Sie erinnern nicht selten an Fettzellen, erscheinen abgerundet oder mit dentritischen Fortsätzen. Die meisten

dieser Zellen sind sehr kurzlebig und verschwinden innerhalb von zwei bis drei Tagen aus der Kultur (5). Einige können gezüchtet werden, sterben aber auch nach einem Zeitraum, der zwischen Wochen und Monaten schwankt.

Auch die Fibrozyten gehen nie spontan in eine etablierte Zellinie über. HAYFLICK und MOORHEAD (33) zeigten, daß sie niemals unbegrenzt gezüchtet werden können. Nach ungefähr neun Monaten erreichen sie eine Phase der Senilität, welche durch eine Verlangsamung ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und eine Starrheit des Aussehens gekennzeichnet ist. Nach einigen Wochen in diesem Stadium endet die Kultur zumeist mit dem Tod aller Zellen (33).

Tumorzellen kann man gewöhnlich an ihrem charakteristischen epithelialen Aussehen in der Zellkultur erkennen und von den Fibrozyten unterscheiden, die ein typisches, spindelförmiges Wachstum zeigen (5). Die Fibrozyten ordnen sich dabei in streng parallel ausgerichteten Linien an und vermehren sich nur solange, bis die Oberfläche gleichmäßig mit einer Zellschicht bewachsen ist, die eine Zelle dick ist ("monolayer").

Selten kommt es vor, daß die Tumorzellen fibrozytenähnlich wachsen oder daß Fibrozyten epitheloid erscheinen. In Einzelfällen gelang hier eine enzymhistochemische Unterscheidung in der Kultur. Die Aminopeptidase ist in Tumorzellen nicht nachweisbar, zeigt aber in Fibrozyten einen starken Reaktionsniederschlag (4).

Eine endgültige Entscheidung, ob es sich bei den Epithelzellen um Tumorzellen handelt, ist jedoch erst nach

Klonierung der epithelialen Zellen möglich, indem man sie in thymusaplastische Mäuse überimpft (vgl. Kap. 5.9).

4.8 Entfernen der Fibrozyten aus der Kultur

Wachsen in einer Primärkultur Fibrozyten und Epithelzellen gemeinsam aus, so wachsen die Fibrozyten meist schneller als die Epithelzellen, umzingeln sie und scheinen sie buchstäblich zu ersticken. Werden sie nicht entfernt oder durch verschiedene Methoden am Wachstum gehindert, so eliminieren sie gewöhnlich die Epithelzellen vor ihrem eigenen Ableben nach etwa neun Monaten.

4.8.1 Mechanisches Entfernen der Fibrozyten

Die Fibrozyten werden unter dem Mikroskop mit einer Pasteurpipette, die an einer Unterdruckpumpe angeschlossen ist, abgesaugt. So werden die Fibrozyten sofort aus der Schale entfernt und es entstehen keine Kratzer auf dem Schalenboden. Die epithelialen Klone werden aber durch den Sog geschädigt. Deshalb darf man nur Fibrozyten absaugen, die nicht in der Nähe epithelialer Klone wachsen.

Bei einer weiteren Möglichkeit werden die Fibrozyten unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Mikromanipulators weggekratzt oder mit einem Jonenbesen wegradiert. Mit dem Mikromanipulator kann man sehr exakt arbeiten und sogar einzelne Fibrozyten gezielt entfernen. Dabei entstehen in der Kulturschale aber Kratzer, über die manche Epithelzellen nicht wachsen können. Mit dem Jonenbesen

ist nur grobes Arbeiten möglich, dafür bleibt die Kulturschale unbeschädigt.

Während durh das Abkratzen die Fibrozyten meist vernichtet werden, bleiben wegradierte Fibrozyten oft vital.

Nach dem Arbeiten spült man die Schale mehrmals mit Medium; trotzdem bleiben immer einige Fibrozyten zurück, lagern sich ab und wachsen erneut aus. Zudem werden die epithelialen Klone durch das Spülen häufig geschädigt, wachsen langsamer oder stellen ihr Wachstum ganz ein.

4.8.2 Entfernen der Fibrozyten durch Trypsinieren

Beim Trypsinieren lösen sich die Fibrozyten meist vor den Epithelzellen. Auch epitheliale Klonteile, die von Fibrozyten infiltriert sind, lösen sich schneller als rein epitheliale Klonteile. So kann man durch kurzes Trypsinieren und gutes Spülen die Fibrozyten einer Schale reduzieren.

4.8.3 Anlage einer Sekundärkultur

Erst werden möglichst viele Fibrozyten mechanisch entfernt. Dann wird die Kultur trypsiniert und in eine neue Schale umgesetzt, die mit vielen, sterilen Glassplittern gefüllt ist. Nach sechs Tagen sucht man unter dem Mikroskop die Glassplitter heraus, auf denen nur Epithelzellen angewachsen sind und gibt sie in kleine mit konditioniertem Medium gefüllte Kulturschalen.

Ein epitheliales Klonfragment wird unter dem Mikroskop aus der Kultur herausgekratzt, mit einer Pasteurpipette aufgesaugt, in Medium gespült und in eine kleine Kulturschale gegeben, die mit konditioniertem Medium gefüllt ist. Das Klonfragment kann sich absetzen und wachsen.

4.9 Klonierung

Um eine Zellinie zu klonieren, muß man eine Einzelzelle isolieren und dieser Zelle die Lebensbedingungen bieten, die sie zu ihrer Vermehrung braucht.

4.9.1 Klonierung mit der Kapillarmethode

Die Spitze einer Pasteurpipette wird über dem Bunsenbrenner zu einer Kapillare ausgezogen. Die Kapillare wird in eine Schale gelegt und mit einer sterilen Pinzette in 3 - 6 mm lange Stücke zerbrochen.
Dann wird eine Zellsuspension (10^4 Zellen/ml) in die Schale pipettiert. Unter dem Mikroskop werden die Kapillarstücke durchgemustert, Stückchen mit Einzelzellen herausgenommen und in einer Schale mit frischem Medium leicht geschwenkt, um auf der Kapillare sitzende Zellen wegzuspülen. Die gespülten Kapillarstückchen werden in kleine Kulturschalen mit konditioniertem Medium gegeben und inkubiert.
Nach einer Woche werden die Kulturschalen überprüft, ob Klone angewachsen sind.

4.9.2 Klonieren mit Cuprak-Gewebekulturschalen

Auf die zentrale Fläche einer Cuprak-Schale wird 1 ml Zellsuspension (100 Zellen/ml) pipettiert und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Zur Befeuchtung wird die umgebende, ringförmige Rinne mit 3 ml sterilem Aqua dest. gefüllt. Dann wird die Schale inkubiert.

Nach einem Tag wird das Medium derartig abgesaugt, daß lediglich in den Vertiefungen Medium zurückbleibt. Unter dem Mikroskop lassen sich Vertiefungen identifizieren und protokollieren, in denen lediglich eine Zelle angewachsen ist.

Diese Vertiefungen werden alle drei Tage betrachtet und das Auswachsen von Klonen notiert. Später kann man ausgewachsene Klone mit üblichen Methoden isolieren.

4.10 Transplantation von Epithelzellen auf eine thymusaplastische (nu/nu) Maus

100 µl Kulturmedium, in dem 5 x 10 Zellen aufgenommen sind, wird mit einer Spritze subkutan in eine thymusaplastische (nu/nu) Maus geimpft. Thymusaplastische Mäuse zeigen keine Transplantatabstoßung, da diese von einer kongenital intakten Thymusdrüse abhängt. So können sich eingeimpfte Zellen im Wirt vermehren (11, 31, 25)(Abb.9).

4.11 Einfrieren

Werden Zellen im Kulturmedium eingefroren, so überleben

sie nicht. Es gelingt aber, wenn man Glycerin oder Dimethylsulfoxid dem Kulturmedium zugibt, und die Zellen langsam abkühlt, aber schnell auftaut. So kann man Zellen über Jahrzehnte aufbewahren (40).

Einfrieren

Die Zellen werden trypsiniert und in Kulturmedium, das mit 10 %igem Glycerin angereichert ist, aufgenommen. Nun werden etwa 10^6 Zellen in sterile Kryoröhrchen pipettiert und die Röhrchen werden verschlossen. Damit die Zellen langsam einfrieren, werden die Röhrchen über Nacht in die Tiefkühltruhe (-30 °C) gelegt, den nächsten Tag in einem Tiefkühler (-70 °C) aufbewahrt und dann in ein Flüssig-Stickstoff-Kühlgerät (-196 °C) gegeben.

Auftauen

Die Ampullen werden aus dem flüssigen Stickstoff genommen und sofort in warmes Wasser (37 °C) gestellt. Sind sie aufgetaut, werden sie geöffnet und das Medium wird aufgesaugt. Die Zellen werden abzentrifugiert, um das Glycerin zu entfernen, in frischem Medium aufgenommen, in Kulturgefäße ausgesät und inkubiert.

5 DARLEGUNG DER ARBEITSERGEBNISSE

5.1 Histologie und Topik der primär angesetzten Tumore

1978 und 1979 wurden 35 maligne Tumore aus dem Kopf- und Halsbereich primär angesetzt.

5.1.1 Karzinome

Es wurden 30 Plattenepithelkarzinome angesetzt (vgl. Tab. 1).

Histologie		Lokalisation und Zahl der Tumore				
		Larynx	Oro-pha-rynx	Paro-tis	Ton-sille	Ohr
differenz.	verhorn.	5	3	1		1
	n.verhorn.	6	4	1	1	
wenig differenz.	verhorn.					
	n.verhorn.	1	1			
ent-differenz.		3	2	1		

Tab. 1: Histologie und Topik der Karzinome

5.1.2 Melanome

Ein malignes Melanom wurde angesetzt.
Es entstammte einer Halsmetastase, bei unbekanntem Primärtumor. Histologisch ergab sich ein vorwiegend amelanotisches Melanom.

5.1.3 Sarkome

In Kultur genommen wurde ein Sarkom aus dem Halsbereich, welches als "verwilderter Tumor, sicher maligne, wahrscheinlich Sarkom" eingestuft wurde.

5.1.4 Neurinome

Es wurde ein Neurinom mit bandförmiger Anordnung der Zellkerne und wenig Kollagen angesetzt, welches vom Nervus acusticus gewonnen wurde.

5.1.5 Sonstiges

Weiterhin wurden zwei Halslymphknotenmetastasen angezüchtet, deren Primärtumore unbekannt waren. Histologisch handelte es sich in beiden Fällen um entdifferenzierte Plattenepithelkarzinome.

5.2 Zahl der Primärkulturen

Von den 35 primär angesetzten Tumoren wuchsen achtmal

keine Zellen aus, sechsmal waren nur Fibrozyten zu erkennen. In 21 Fällen zeigten sich epitheliale Zellklone und Fibrozyten.

5.3 Wachstumsverhalten der Primärkulturen

5.3.1 Zeitraum zwischen dem Ansetzen der Kulturen und dem Auswachsen der ersten epithelialen Zellen

In 21 Primärkulturen wuchsen epitheliale Zellklone aus.

Drei Tage nach dem primären Anrichten waren bei zwölf Kulturen Epithelzellen ausgewachsen.

Sechs Tage nach dem Ansetzen waren in neunzehn Fällen Epithelzellen gezüchtet.

Neun Tage nach der Präparation waren in allen 21 Kulturen epitheliale Zellen ausgewachsen.

Etwa 50 % aller epithelialen Klone einer Primärkultur entstanden zu Beginn des Auswachsens. Die restlichen epithelialen Klone derselben Kultur entstanden bis zu zwei Wochen später, nachdem die ersten Epithelzellen ausgewachsen waren.

5.3.2 Lebensdauer der Epithelzellen in der Kultur

Die epithelialen Klone werden unter den Gesichtspunkten Wachstumsdauer, Wachstumsstillstand, gesamte Lebensdauer und maximale Klongröße dargestellt (Tab. 2).

Wachstumsdauer meint den Zeitraum, in dem sich die

Epithelzellen vermehren und die Klone wachsen (s. auch Abb. 1).

Wachstumsstillstand bezeichnet den Zeitraum, während dessen die epithelialen Klone vital sind und nicht degenerieren, aber auch nicht mehr wachsen.

Die gesamte Lebensdauer umfaßt den Zeitraum vom Auswachsen der ersten Epithelzellen bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Epithelzellen aus der Kultur verschwunden sind.

Die maximale Klongröße beschreibt die ungefähre Zellzahl des größten Klones einer Primärkultur (s. auch Abb. 2).

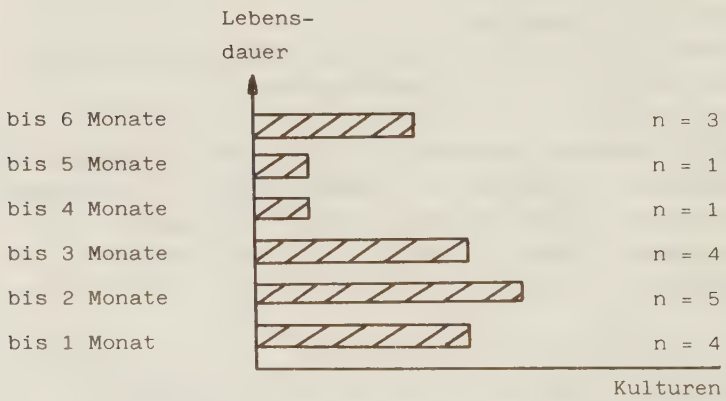


Abb. 1: Lebensdauer der Epithelzellen von 18 primär angesetzten Tumoren

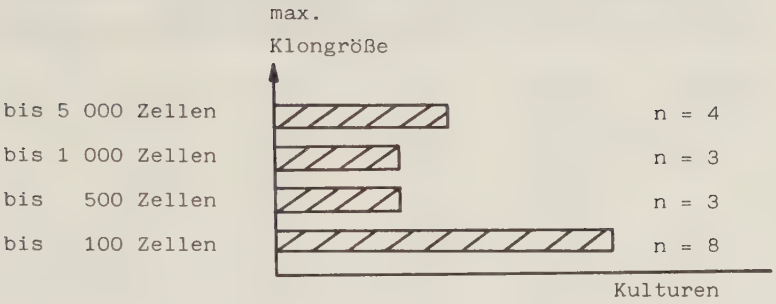


Abb. 2: Maximale Klongröße epithelialer Zellen der 18 primär angesetzten Tumoren aus Abbildung 1

5.3.3 Subkultivierung

Es wurde versucht, achtzehn Primärkulturen umzusetzen. In dreizehn Sekundärkulturen wuchsen erneut epitheliale Zellklone aus, in fünf Sekundärkulturen wuchsen jedoch nur Fibrozyten an.

Nur fünf Sekundärkulturen konnten ein zweites Mal passagiert werden (ein Larynxkarzinom, ein Parotiskarzinom, zwei Oropharynxkarzinome und ein malignes Melanom).

Die beiden Oropharynx-Karzinom-Kulturen wurden insgesamt dreimal bzw. viermal subkultiviert. Die Zellkulturen des Larynxkarzinoms, des Parotiskarzinoms und des malignen Melanoms konnten in permanente Zellinien überführt werden.

Histologie und Topik	Bezeichnung	Herkunft	Ansatzmethode	Wachstum
Larynxkarzinome	F.W.K.	P.T.	mech.	Ø
	K.H.K.	Met.	mech.	Ø
	P.E.K.	P.T.	mech.	Ø
	W.A.K.	Met.	mech.	Ø
	Ö.F.K.	Met.	mech.	F
	Ö.E.K.	P.T.	mech	F/EK
	H.A.K.	P.T.	mech.	F/EK
	S.A.K.	Met.	mech./enz.	F/EK
	S.E.K.	Met.	mech.	F/EK
	R.F.K.	P.T./Met.	mech.	F/EK
	J.W.K.	Met.	mech./enz.	F/EK
	M.L.K.	Met.	mech.	F/EK
	H.K.K.	P.T.	mech.	F/EK
	T.J.K.	Met.	mech./enz.	F/EK
	HLaC 79	Met.	mech.	F/EK
Oropharynxkarzinome	M.E.Z.	P.T.	mech.	Ø
	D.W.M.	Met.	mech.	Ø
	B.E.M.	P.T.	mech.	F
	R.K.M.	P.T./Met.	mech.	F
	B.L.Z.	P.T./Zyste	mech./Fls.	F/EK
	R.K.Z.	P.T.	mech.	F/EK
	B.L.M.	P.T.		F/EK

Tab. 2: Aufstellung der primär angesetzten Tumore und Wachstum der Epithelzellen

Wachstums-dauer	Wachtums-stillst.	gesamte Lebens-dauer	größter Klon(ca) Zellzahl	Passagen umges. (Zahl)	Wachstum
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
Pilzinfekt	-	-	-	-	-
4 Tage	10 Tage	2 Wochen	100	1	F/EK
1 Woche	3 Wo.	4 "	100	1	F/EK
2 "	2 "	4 "	100	-	-
4 "	4 "	2 Monate	1000	1	F/EK
7 "	14 "	6 "	1000	1	F/EK
8 "	4 "	3 "	5000	1	F
10 "	6 "	4 "	5000	1	F/EK
12 "	4 "	6 "	5000	1	F/EK
Dauerkul.	-	-	-	75	EK
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
4 Tage	6 Tage	2 Wochen	100	-	-
2 Wochen	6 Wochen	2 Monate	100	1	F
5 "	7 "	3 "	1000	1	F/EK

Histologie und Topik	Bezeichnung	Herkunft	Ansatzmethode	Wachstum
Oropharynxkarzinome	F.E.M.	P.T./Met.	mech./enz.	F/EK
	F.A.Z.	Met.	mech.	F/EK
	S.H.Z.	P.T.	mech.	F/EK
Parotiskarzinome	S.E.P.	Met.	mech.	F
	S.L.P.	Met.	mech.	F/EK
	H PaC 79	Met.	mech.	F/EK
Ohrmuschelkarzinom	H.K.O.	Met.	mech.	F/EK
Lymphknoten; P.T. unbekannt	G.H.L.	LK	mech.	F
	P.W.L.	LK	mech.	F/EK
Tonsillenkarzinom	B.F.T.	P.T.	mech.	Ø
Melanom	H Me 78	Met.	mech.	F/EK
Sarkom	M.J.S.	P.T.	mech.	Ø
Neurinom	F.N.N.	P.T.	mech.	F

Tab. 2: Fortsetzung

Wachstums-dauer	Wachtums-stillst.	gesamte Lebens-dauer	größter Klon(ca.) Zellzahl	Passagen umges. (Zahl)	Wachstums
6 Wochen	4 Woch.	3 Mon.	500	-	-
4 Monate	2 "	5 "	100	-	-
4 "	4 "	6 "	500	-	-
-	-	-	-	-	-
4 Woch.	6 Woch.	3 Mon.	500	1	F/EK
Dauerkul.	-	-	-	50	EK
3 Wochen	3 Woch.	2 Mon.	100	1	F
-	-	-	-	-	-
1 Woche	3 Woch.	6 Woch.	5000	1	F
-	-	-	-	-	-
Dauerkul.	-	-	-	72	EK
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-

P.T. = Primärtumor; Met. = Metastase; Flsgkt. = Punktionsflüssigkeit; F. = Fibrozyten; EK = epitheliale Klone

5.4 Einfluß der Primärkultur-Technik auf das Auswachsen epithelialer Zellen

Bei der Anlage von vier Primärkulturen wurde ein Teil des Tumorgewebes enzymatisch aufgelöst, der Rest mechanisch zerlegt (Tab. 3).

Histologie und Topik	Bezeichnung	Wachstum n. Beh.m. Trypsin	Wachstum n. Beh.m. Kollagenase	Wachstum n. mech. Zerl. des Tumors
Larynx-Ca	T.I.K.	(+)	(++)	(++)
Larynx-Ca	I.W.K.	(+)	(++)	(+)
Larynx-Ca	S.A.K.	(-)	(+)	(+)
Oroph.-Ca	F.E.M.	(-)	(+)	(+)

(-) : Kein Wachstum von Epithelzellen
(+) : Auswachsen von wenigen Epithelzellen
(++) : frühzeitiges Auswachsen von vielen Epithelzellen

Tab. 3: Einfluß der Ansatzmethoden auf das epitheliale Wachstum

Das Ansetzen der Primärkulturen durch mechanisches Zerlegen des Tumorgewebes war etwa gleich erfolgreich wie das Ansetzen durch Auflösen der Tumoren mit Kollagenase. Bei vier Primäransetzungen wuchsen in jeder Kultur epitheliale Zellen aus. Wurde das Tumorgewebe mit Trypsin aufgelöst, wuchsen bei den vier Primäranrichtungen nur in zwei Kulturen epitheliale Zellen aus.

Bei einem Tumor (Oropharynx-Karzinom B.L.M.) wurde zunächst Punktionsflüssigkeit aus einer Tumorzyste, vier Tage später der Primärtumor angesetzt.
In beiden Fällen waren zwei Tage nach dem Ansetzen große epitheliale Klone ausgewachsen, die nur langsam weiterwuchsen, nach zehn Tagen degenerierten und verschwanden.

5.5 Einfluß verschiedener Kulturmedien auf das Auswachsen epithelialer Zellen

Beim Anlegen der 35 Primärkulturen wurden neun verschiedene Medien verwandt. Alle 35 Kulturen wurden mit BME (Earle), neunzehn Kulturen zusätzlich mit weiteren Kulturmedien angesetzt (Tab. 4).

Wurden die Medien BME (Earle) und BME (Hank) bei der Anlage einer Kultur verwandt, so lieferten sie die gleichen Auswachsergebnisse.

Auch in den Medien MEM (Earle), MEM (Hank) und MEM (Dulbecco) vermehrten sich die Epithelzellen gleich gut.

In fünf Kulturen wuchsen lediglich in dem Medium BME, in zwei Kulturen sowohl im Medium BME wie auch in RPMI Epithelzellen.

Schließlich entwickelten sich die Epithelzellen einer Kultur nur in dem Medium MEM.

5.6 Mischwachstum von Epithelzellen und Fibrozyten

In 21 Primärkulturen wuchsen gleichzeitig epitheliale

Klone und Fibrozyten aus. Während die epithelialien Klone meist aus Gewebsstückchen auswuchsen, bildeten sich die Fibrozytenklone häufig aus einzelnen, abgesetzten Fibrozyten. Fibrozytenklone in der Nähe epithelialer Klone wuchsen schneller als die restlichen Fibrozytenklone der Kultur. Sie wuchsen meist auch schneller als die epithelialen Klone, legten sich kreisförmig um diese und mauerten sie ein (Abb. 10).

In den ersten Tagen nach Anlage einer Primärkultur vermehren sich die Fibrozyten noch langsam, aber nach zwei bis sechs Wochen setzt ein explosionsartiges Wachstum ein. Deshalb ist man versucht, die Fibrozyten gleich in den ersten Tagen der Kultur zu entfernen. Die epithelialen Klone sind aber noch sehr empfindlich und durch alles Manipulieren an der Schale, wie durch Kratzen und Spülen, leicht zu schädigen. Auch darf man in den ersten Wochen der Primärkultur nicht alle Fibrozyten entfernen, denn oft stellen die epithelialen Klone ihr Wachstum ein und degenerieren.

5.6.1 Degeneration epithelialer Klone ohne Fibrozyten-Kontakt

Bei zwei primären Larynxkarzinom-Kulturen (H.A.K. und S.E.K.) degenerierten die epithelialen Klone bereits bevor die Fibrozyten sich vermehren und sie einkreisen konnten.

Medium	Primärkulturen																		
	Larynx-karzinome									Mund-karzinome				L.K.-Metast.		Pa-rot.	Sar-kom	Ton-sil.	Mela-nom
	SAK	RFK	JWK	HAK	HKK	SEK	TJK	ÖFK	WAK	FEM	BLM	BLZ	DWM	PWL	GHL	SEP	MJS	BFT	HMe 78
BME (Earle)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
BME (Hank)	(+)	(+)	(+)						(-)	(+)	(-)	(-)						(-)	
MEM (Earle)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)		(+)
MEM (Hank)	(+)	(-)	(+)	(-)						(+)	(-)								(+)
MEM (Dulbecco)	(+)	(-)	(+)		(-)	(-)	(-)	(-)		(+)	(-)	(+)		(-)	(-)	(-)	(-)		
RPMJ	(+)	(+)	(+)		(+)	(-)				(+)	(-)	(-)	(-)			(-)			
Medium 199	(+)									(+)	(-)								
McCoy	(+)									(-)	(-)								
Medium L 15	(+)									(-)	(-)								(+)

Tab. 4: Kulturmedien und epitheliales Wachstum

5.6.2 Degeneration epithelialer Klone nach Fibrozytenkontakt

Bei elf Primärkulturen (sechs Oropharynxkarzinom-Kulturen: B.E.M., B.L.M., F.E.M., F.A.Z., R.K.Z., S.H.Z.; drei Larynxkarzinom-Kulturen: R.F.K., H.K.K., M.L.K.; einer Parotiskarzinom-Kultur: S.L.P.; einer Lymphknoten-Metastasen-Kultur: P.W.L.) legten sich die Fibrozyten kreisförmig um die epithelialen Klone. Die Fibrozyten hingen untereinander fest zusammen, waren aber nicht mit den Epithelzellen verbunden. Mit einem Gummischaber konnte man sie leicht wegziehen.

Hatten die Fibrozyten einen epithelialen Klon eingemauert, so begann dieser nach ein bis vier Wochen zu degenerieren. Entfernte man die Fibrozyten frühzeitig, so wuchs der epitheliale Klon ungestört weiter.

5.6.3 Degeneration epithelialer Klone nach Fibrozyteninfiltration

Bei vier primären Larynxkarzinom-Kulturen (J.W.K.,S.A.K., T.J.K.) sowie einer primären Ohrmuschelkarzinom-Kultur (H.K.O.) wuchsen die Fibrozyten infiltrierend in die epithelialen Klone ein. Die Fibrozyten hingen untereinander nicht zusammen, sondern lagen einzeln zwischen den Epithelzellen und waren über Zellausläufer mit diesen verbunden. Nach zwei bis drei Tagen lösten sich die ersten Epithelzellen ab und es entstanden Dehiszensen im epithelialen Klon. Bereits nach einer Woche war der ganze epitheliale Klon verschwunden. Da die Fibrozyten zwischen den Epithelzellen lagen, wurden die infiltrierten Klone

und Klonteile ganz wegradiert oder trypsiniert. Es konnten aber nie sämtliche Fibrozyten entfernt werden, so daß die verbliebenen Fibrozyten die epithelialen Klone vollständig zerstören konnten.

Deshalb wurden nicht infiltrierte Klonteile vorsichtig aufgesaugt und in Cuprakschalen umgesetzt. Die Klonfragmente lagerten sich ab und es wuchsen drei bis fünf Zellreihen aus. Nach einer Woche stagnierte aber das Wachstum, die Zellen degenerierten und lösten sich nach drei Wochen ab.

5.6.4 Verdrängung von Fibrozyten durch Epithelzellen

Bei der Kultur eines Parotiskarzinoms ($HPaC^{+}$ 79) wurden die epithelialen Klone zwar von Fibrozyten eingekreist, die epithelialen Klone wuchsen aber weiter und drängten die Fibrozyten zurück. Wurde die Kultur umgesetzt und hatten die Zellen mehr Raum, so vermehrten sich die Fibrozyten wieder verstärkt. Erst wenn die Kulturschale zugewachsen war, konnten die Epithelzellen die Fibrozyten erneut zurückdrängen.

Bei der Kultur eines Larynxkarzinoms (HLaC 79) und eines Melanoms (HMe 78) vermehrten sich die Epithelzellen schneller als die Fibrozyten. Je öfter die Kulturen umgesetzt wurden, desto leichter konnten die Epithelzellen die Fibrozyten überwuchern und verdrängen.

5.7 Etablierte Zellinien

Es wurden 35 Tumoren angesetzt, aus diesen wuchsen 21 epitheliale Primärkulturen aus. Drei Kulturen gingen in Dauerkulturen über. Zwei Dauerkulturen (HMe 78, HLaC 79) konnten über 70 mal subkultiviert werden und dürfen deshalb als etablierte Zellinien bezeichnet werden (7). Eine Dauerkultur (HPaC 79) wurde bis heute 50 mal subkultiviert.

5.7.1 Etablierung der Melanomzellinie (HMe 78)

Am 13.06.1978 wurde die Metastase eines malignen Melanoms aus dem linken Unterkieferwinkelbereich chirurgisch entfernt und in der Zellkultur angesetzt.

Histologie
Es liegt ein polymorphkerniger, maligner Tumor vor, der zahlreiche atypische Mitosen aufweist. Manchmal sieht man Riesenzellen, z. T. mehrkernig. In einzelnen Zellen kann man Pigment nachweisen. Es handelt sich um ein vorwiegend amelanotisches Melanom.*

Primärkultur
Das Tumorgewebe wurde in einer Kulturschale mechanisch zerlegt, die gewonnene Zellsuspension verdünnt (10^4 Zellen pro ml) und inkubiert. Als Kulturmedien wurden BME (Earle), MEM (Earle), MEM (Hank) und L_{15} verwandt.

*Für die histologische Begutachtung danke ich Herrn Dr. Wünsch, Path.Inst.der Univ.Würzburg(Dir.Prof. Dr. Altmann)

Zellwachstum

Bereits nach drei Tagen waren in allen Kulturschalen Fibrozyten und epitheliale Klone (5 - 20 Zellen) ausgewachsen. Im Medium BME (Earle) waren die meisten Zellen angewachsen, im Medium L15 die wenigsten.
Im Medium MEM (Hank) wuchsen hauptsächlich Epithelzellen und nur wenige Fibrozyten.

Nach sechs Tagen bestanden die größten epithelialen Klone bereits aus mehr als 100 Zellen und verlangsamten ihr Wachstum. Die Fibrozyten wuchsen unverändert schnell weiter.

Nach neun Tagen wurde das alte Medium zur Hälfte abgesaugt und durch frisches ersetzt. Anschließend wurde das Medium, abhängig von der Zelldichte und dem Zellwachstum in der Kulturschale, alle drei bis sechs Tage gewechselt.

Nach zwei bis drei Wochen trat bei den Epithelzellen eine Wachstumskrise ein. Bei vielen Epithelzellen erschienen Vakuolen im Zytoplasma, die Zellen degenerierten und lösten sich ab. Die epithelialen Klone zeigten Dehiszensen. Manche stellten ihr Wachstum ein, andere wuchsen weiter. Das Wachstum besserte sich nicht, wenn mit konditioniertem Medium gefüttert oder das Medium in längeren oder kürzeren Abständen erneuert wurde.

Die Fibrozyten vermehrten sich rasch und nach drei Wochen wurden die ersten epithelialen Klone eingekreist. An manchen Stellen umzingelten die Fibrozyten die Epithelklone nur, an anderen wuchsen sie über die epithelialen Klone hinweg, ohne sie jedoch zu schädigen. Wurden die Fibrozyten weggekratzt, wuchsen die Epithelzellklone normal weiter.

Nach fünf Wochen wurde erstmals versucht, die Kultur

umzusetzen und dabei gleichzeitig die Fibrozyten zu eliminieren. Aus einem epithelialen Klon wurden Klonfragmente vorsichtig herausgerissen, aufgesaugt, gespült und in Cuprakschalen mit konditioniertem Medium neu angesetzt. Die Klonfragmente wuchsen jedoch nicht an und wurden verworfen.

Nach sieben Wochen wurde die Kultur trypsiniert. In Anwesenheit von MEM (Hank) waren fast nur Epithelzellen gewachsen. Die wenigen Fibrozyten wurden möglichst vollständig entfernt. Dann wurde das alte Medium abgesaugt, mit PBS gespült und trypsiniert. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur hatten sich etwa 25 % der Zellen gelöst. Sie wurden in Kulturmedium aufgenommen, neu ausgesät und inkubiert. Auch die Zellen der trypsinierten Schale wurden weiter kultiviert. Während die Zellen in der trypsinierten Schale normal weiterwuchsen, entwickelte sich in der Sekundärschale kein Wachstum.

Nach neun Wochen wurde diesselbe Schale erneut trypsiniert und die Kultur umgesetzt. Diesmal wuchsen Epithelzellen an und vermehrten sich langsam. Es setzten sich auch einige Fibrozyten ab, aber sie konnten sich nicht entscheidend vermehren. Die Epithelzellen behielten das Übergewicht. Im Verlauf von vier Wochen bildete die Sekundärkultur einen dichten Zellrasen und konnte umgesetzt werden. Auch die Tertiärkultur wuchs nur langsam.

Nach vier Monaten und in der vierten Passage beschleunigte sich das Wachstum und es zeigte sich ein konstant rasches Wachstum und Vermehrung der Epithelzellen.

Die Zellen leben seit 38 Monaten in vitro und wurden bereits 72 mal subkultiviert (Abb. 6). Sie zeigen keine Kontaktinhibition und ihre Verdopplungszeiten bleiben

konstant. Gibt man 10^6 Zellen in eine Kulturschale, so vermehren sie sich in drei Tagen zu einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen (Abb. 3).

Die Zellen wachsen auf Glas- und Plastikmaterial gleichermaßen.

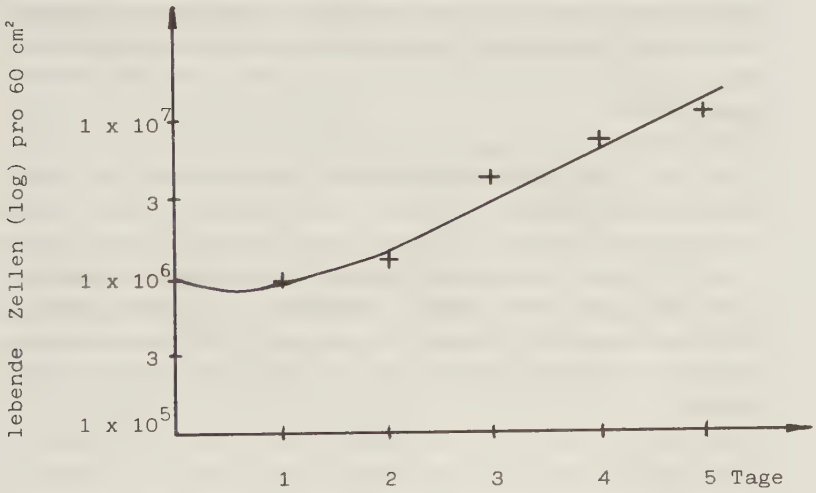


Abb. 3: Wachstumskurve der Melanomzellinie HMe 78:
Es wurden 1×10^6 Zellen in eine Schale mit 5 ml Medium (BME (Earle)) ausgesät.

5.7.1.1 Klonierung der Melanom-Zellinie

Fünf Monate nach Anlegen der Kultur und in der zwölften Passage wurde die Melanom-Zellinie kloniert.

Es wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 100 Zellen/ml hergestellt und auf fünf Cuprakschalen pipettiert. Am nächsten Tag wurden 24 Vertiefungen gefunden, in denen nur eine Zelle angewachsen war und weiter kontrolliert.

In sechs Vertiefungen teilte sich die Zelle einmal.

In zwei Vertiefungen entstanden kleine Klone mit vier und sechs Zellen.

Nur in einer Vertiefung entstand ein stetig wachsender Klon, der nach vier Wochen umgesetzt und weiter kultiviert werden konnte. Diese Zellinie, die von einer einzigen Zelle abstammt, wurde HMe 78 (Humanes Melanom 1978) genannt.

5.7.1.2 Melaninnachweis

In Melanomzellen kann man Melaninpigment nachweisen. Dazu wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen gezüchtet und nach der Eisenmethode für Melanin (35) angefärbt. Unter dem Mikroskop konnte man in den Zellen Melaninpigment sehen.

5.7.1.3 Transplantation auf (nu/nu) Mäuse

Es wurden Zellen der Linie HMe 78 auf drei thymusaplasti-

sche (nu/nu) Mäuse überimpft.
Sie erzeugten nach etwa einer Woche in jeder Maus einen malignen Tumor, der histologisch dem ursprünglichen Tumor glich (Abb. 11,12).

So konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den kultivierten Zellen um die Zellen des ursprünglichen Tumors handelt.

5.7.2 Etablierung der Larynxkarzinom-Zellinie HLaC 79

Am 21.05.1979 wurde Gewebe aus einer Halsmetastase eines Stimmlippen-Karzinoms chirurgisch entfernt und in der Zellkultur angesetzt.
Der Primärtumor war bereits in den rechten Sinus piriformis eingebrochen (T_4 N_1 Mo).

Histologie
Es liegt ein ulcerierter Tumor vor, der aus plattenepithelähnlichen Zellen aufgebaut ist und viele Nekrosezonen aufweist. Man sieht ausgeprägte Atypien und eine große Zahl von Mitosen, darunter auch atypische Kernteilungsfiguren sowie deutlich infiltrierendes Wachstum. Es handelt sich um ein vorwiegend indifferenziertes Plattenepithel-Karzinom des Larynx.*

Primärkultur

Das Tumorgewebe wurde in einer Kulturschale mechanisch

*Für die histologische Begutachtung danke ich Herrn Prof. Dr. Roß, Path. Institut der Universität Würzburg (Dir. Prof. Dr. Altmann)

zerlegt, die gewonnene Zellsuspension verdünnt (10^4 Zellen) und inkubiert. Als Kulturmedium wurde BME (Earle) verwandt.

Zellwachstum

Nach drei Tagen waren einige Fibrozyten, nach sechs Tagen auch einige Epithelzellen zu erkennen, die sich nur langsam vermehrten.

Nach neun Tagen wurde das Kulturmedium erstmals erneuert, anschließend wurde die Kultur alle drei bis sechs Tage gefüttert.

Nach drei Wochen trat bei den Epithelzellen eine Wachstumskrise auf. Besonders die Zellen im Zentrum der Klone degenerierten und lösten sich. Die Lücken wurden aber durch vitale Zellen wieder gefüllt.

Nach vier Wochen wurden die ersten epithelialen Klone von Fibrozyten eingekreist. Aus einer Kulturschale wurden alle Fibrozyten entfernt, daraufhin stellten auch die epithelialen Klone ihr Wachstum ein. Deshalb wurden nur noch Fibrozyten weggekratzt, die die epithelialen Klone umzingelten und am Wachstum hinderten.

Nach fünf Wochen besaßen die größten epithelialen Klone kaum mehr als 100 Zellen. Trotzdem wurde eine Kulturschale trypsiniert (0,25 %iges Trypsin wirkte 5 min. lang ein, worauf sich etwa 50 % der Zellen lösten) und die Zellen umgesetzt. In der Sekundärkultur wuchs ein Gemisch von Fibrozyten und Epithelzellen aus und einige reine epitheliale Klone. Wieder waren die Epithelzellen allein nicht lebensfähig. Wurden zuviele Fibrozyten entfernt, ging die Kultur ein.

Die Zellinie wurde nun etwa alle vier Wochen subkultiviert und bei jeder Passage verbesserte sich das Verhält-

nis Epithelzellen zu Fibrozyten zugunsten der Epithelzellen.

Nach sieben Monaten und zehn Passagen beschleunigte sich das Wachstum der Zellen.

Nach neun Monaten und sechzehn Passagen waren mikroskopisch keine Fibrozyten mehr zwischen den Epithelzellen zu entdecken.

Die Zellen leben seit 27 Monaten in vitro und wurden bereits 75 mal subkultiviert (Abb. 7). Sie zeigen keine Kontaktinhibition und ihre Verdopplungszeiten bleiben konstant. Gibt man 10^6 Zellen in ein Kulturgefäß, so vermehren sie sich in vier Tagen zu einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen (Abb. 4).

Die Zellen wachsen auf Glas- und Plastikmaterial gleichermaßen.

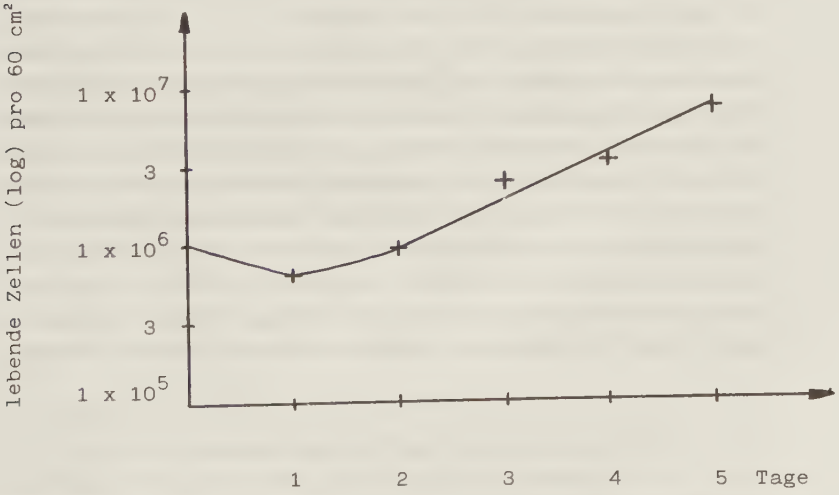


Abb. 4: Wachstumskurve der Larynxkarzinom-Zellinie HLaC 79. Es wurden 1×10^6 Zellen in 5 ml BME (Earle) Medium angesetzt.

5.7.2.1 Klonierung der Larynxkarzinom-Zellinie

Neun Monate nach Anlage der Kultur und in der 16. Passage wurde versucht, die Larynxkarzinom-Zellinie mit Hilfe von Cuprakschalen zu klonieren.

Es wurde eine Zellsuspension mit der Konzentration 100 Zellen/ml hergestellt und auf fünf Cuprakschalen pipettiert. In 27 Vertiefungen wuchsen einzelne Zellen an, aber sie teilten sich nur ein- bis zweimal und es entstand kein epithelialer Klon. Ein Monat später wurde in der 20. Passage ein zweites Mal erfolglos versucht, die Zellinie mit Hilfe von Cuprakschalen zu klonieren.

Sechzehn Monate nach Anlage der Kultur und in der 40. Passage konnte die Larynxkarzinom-Zellinie mit Hilfe der Kapillarmethode kloniert werden.

In eine Schale mit etwa 100 Kapillarstückchen wurde eine Zellsuspension (10^4 Zellen/ml) pipettiert. Es wurden neun Kapillare mit Einzelzellen gefunden, in Kulturschalen gegeben und inkubiert. In einer Kapillare teilte sich die Epithelzelle, vermehrte sich und es entstand ein Klon, der aus der Kapillare auswuchs und sich in der Kulturschale ausbreitete. Die Kultur konnte umgesetzt und weitergezüchtet werden.
Diese Zellinie, die von einer einzigen Zelle abstammt, wurde HLaC 79 (Humanes Larynx Carcinom 1979) genannt.

5.7.2.2 Transplantation auf (nu/nu) Mäuse

Um nachzuweisen, daß es sich bei den kultivierten Zellen um die Karzinomzellen des ursprünglichen Tumors handelt,

wurden Zellen der Linie HLaC 79 auf drei thymusaplastische Mäuse überimpft.

Sie erzeugten nach etwa einer Woche in jeder Maus einen malignen Tumor, der histologisch dem ursprünglichen Larynxtumor glich (Abb. 13,14).

5.7.3 Etablierung einer Zellinie aus einem Parotis-Karzinom

Am 01.08.1979 wurde die Halsmetastase eines Parotis-Karzinoms chirurgisch entfernt und in der Zellkultur angesetzt.

Histologie
Es liegt ein eindeutig maligner, infiltrierend wachsender Tumor vor. Er weist hochgradige Kernpolymorphie auf. Häufig sieht man Riesenzellen. Viele Mitosen, auch atypische, sind vorhanden. Hin und wieder sind Tumorabschnitte erkennbar, in denen angedeutet spindelige oder zylindrische Zellen vorkommen. An anderen Stellen sind die Tumorzellen eckig oder angedeutet rundlich. Eindeutig plattenepitheliale Differenzierungen sieht man nicht.
Es handelt sich um einen hochmalignen Tumor, wahrscheinlich ein völlig entdifferenziertes Karzinom.*

Primärkultur
Das Tumorgewebe wurde in einer Kulturschale mechanisch zerlegt, die gewonnene Zellsuspension verdünnt (10^4 Zellen/ml) und inkubiert. Als Kulturmedium wurde BME (Earle)

*Für die histologische Begutachtung danke ich Herrn Prof. Dr. Roß,Path.Inst. der Univ.Würzburg(Dir.Prof.Dr.Altmann)

verwandt.

Zellwachstum

Nach drei Tagen waren noch keine Zellen ausgewachsen.

Drei Tage später zeigten sich Fibrozyten und epitheliale Klone (20 - 30 Zellen).

Am neunten Tag wurde das Kulturmedium erstmals gewechselt und anschließend alle drei bis sechs Tage erneuert.

Ab der vierten Woche wurden die ersten epithelialen Klone von Fibrozyten eingekreist. Die Fibrozyten wuchsen nicht in die epithelialen Klone ein und schädigten sie auch nicht. Es durften nicht alle Fibrozyten entfernt werden, da die epithelialen Klone drohten, ihr Wachstum einzustellen und zu degenerieren.

Nach fünf Wochen hatten die größten epithelialen Klone etwa 100 Zellen erreicht, so daß eine Kultur umgesetzt werden konnte.

In dieser Sekundärkultur wuchsen viele Fibrozyten, aber nur wenige Epithelzellen an. Die Fibrozyten vermehrten sich rasch, nach drei Wochen hatten die Fibrozyten einen geschlossenen Zellrasen gebildet, in dem einige kleine, rein epitheliale Zellklone eingebettet lagen. Obwohl die epithelialen Klone ganz eingemauert waren, wuchsen sie langsam weiter und verdrängten die Fibrozyten.

Deshalb wurden einige Sekundärkulturen lediglich gefüttert, jedoch nicht weiter umgesetzt. Mehrere dieser Kulturen starben nach drei Monaten, aber zwei Kulturen blieben vital. Die Epithelzellen vermehrten sich zunehmend unter Rückgang der Fibrozyten und nach sechs Monaten waren in den Kulturen nur noch wenige Fibrozyten zu entdecken. Nun stagnierte das Wachstum der Epithelzellen

und die Kulturen wurden subkultiviert. Wiederum wuchsen die Fibrozyten schneller aus als die Epithelzellen und gewannen an Zahl. Um die Fibrozyten ganz zu eliminieren, wurde die Kultur nur alle vier bis sechs Wochen passagiert.

Dreizehn Monate nach Anlage der Kultur und in der achten Passage waren in der Zellinie mikroskopisch nur noch Epithelzellen zu erkennen. Auch enzymhistochemisch ergab sich aufgrund des Nachweises der Aminopeptidase kein Hinweis auf den Verbleib von Fibrozyten.

Ab der achten Woche (nach Anlage der Kultur) wurden zwei Kulturschalen jede Woche einmal umgesetzt. Die Epithelzellen konnten sich nicht entscheidend vermehren und noch in der 35. Passage bestand die Kultur hauptsächlich aus Fibrozyten, zwischen denen einige kleine, epitheliale Klone lagen.

Die Epithelzellen leben seit 25 Monaten in vitro und wurden 50 mal subkultiviert (Abb. 8). Sie zeigen keine Kontaktinhibition und ihre Verdoppelungszeiten bleiben konstant. Gibt man 10^6 Zellen in ein Kulturgefäß, so vermehren sie sich in fünf Tagen zu einer Zellzahl von 3×10^6 Zellen (Abb. 5). Die Zellen wachsen gleich gut auf Glas- und Plastikmaterial.

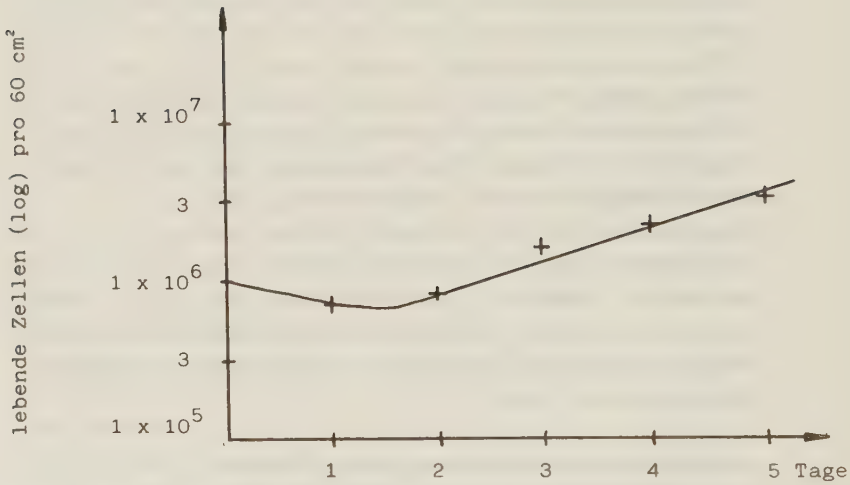


ABb. 5: Wachstumskurve der Parotiskarzinom-Zellinie HPaC⁺79. Es wurden 1 x 10^6 Zellen in 5 ml BME (Earle) Medium angesetzt.

5.7.3.1 Klonierungsversuche

Vierzehn Monate nach Anlage der Kultur und in der zehnten Passage wurde mit der Kapillarmethode und mit Hilfe von Cuprakschalen versucht, die Parotiskarzinom-Zellinie zu klonieren.

Es wuchsen in Kapillaren und in Vertiefungen der Cuprakschalen viele Einzelzellen an, teilten sich auch

ein- bis zweimal, aber es entstand kein Klon. Lagen aber in einer Vertiefung oder Kapillare mindestens fünf Zellen beieinander, so wuchsen sie, vermehrten sich und bildeten einen Klon.
24 Monate nach Anlage der Kultur und in der 30. Passage wurde erneut versucht, die Zellen zu klonieren. Es zeigte sich wieder das gleiche Bild wie vor zehn Monaten. Einzelzellen starben ab, nur wenn mehrere Zellen in einer Kapillare lagen, konnte ein Klon auswachsen.
Einer dieser Klone, der von fünf Zellen abstammt, wurde weiter kultiviert und als "teilkloniert" betrachtet. Es wird $HPaC^+$ 79 (Humanes Parotis Carcinom 1979) genannt.

5.7.3.2 Transplantation auf (nu/nu) Mäuse

Um nachzuweisen, daß es sich bei den kultivierten Zellen um die Zellen des ursprünglichen Tumors handelt, wurden Zellen der Linie $HPaC^+$ 79 auf drei thymusaplastische Mäuse geimpft.
Sie erzeugten nach etwa einer Woche in jeder Maus einen malignen Tumor, der histologisch dem ursprünglichen Tumor ähnelte (Abb. 15,16).

5.8 Chromosomenanalyse der klonierten Melanomzelllinie HMe 78 und der klonierten Larynxkarzinom-Zellinie HLaC 79

Wenn sich normale Zellen differenzieren, zeigen die Chromosomen keine meßbare Änderung. Maligne Tumorzellen zei-

gen jedoch häufig einen Karyotyp, der vom normalen abweicht (3).

Bei den etablierten Zellinien HMe 78 und HLaC 79 wurden Metaphasen untersucht.*
Es wurden nur hyperploide Zellen gefunden, wobei in allen Chromosomengruppen mehr als die normale Anzahl an Chromosomen zu finden war. In Tabelle 5 werden die Karyogramme von vier Zellen der Larynxkarzinom-Zellinie aufgezeigt. Es sind auch aberrante Chromosomen zu erkennen (centrische Doppelfragmente), wie man sie oft in Tumorzellen findet. Diese Aberrationen lassen auf den Umbau der Chromosomen schließen.

Zelllinie	Chromosomenzahl	zusätzliche Chromosomen
HLaC 79	1. 55 xy	+2, +3, +B, +4C, +2D
	2. 63 xy	+1, +2B, +8C, +D, +18, + 4F
	3. 57 xy	+1, +2, +3, +B, +3C, +2D, +2G
	4. 54 xy	+B, +4x, +D, +2 centrische Doppelfragmente

Tab. 5: Karyogramm der Larynxkarzinom-Zellinie HLaC 79

*Für die Chromosomenanalyse danke ich Frau Dr. C. Stahl-Mangê, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Heidelberg

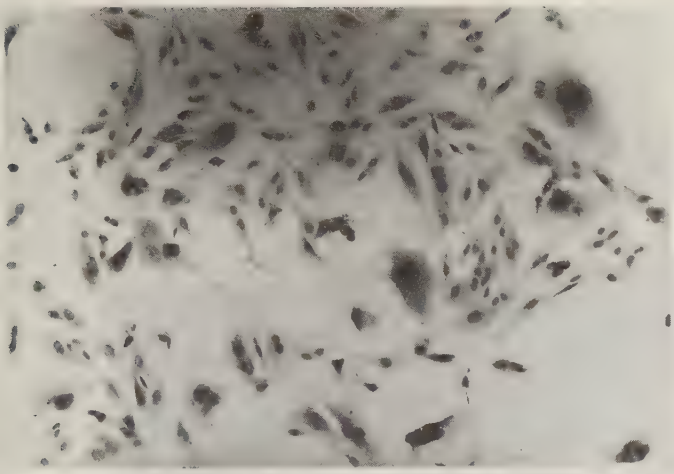


Abb. 6:
Zellen der Melanom-zellinie HMe 78 in Kultur
(Passage 39)
(Vergrößerung 300 mal)

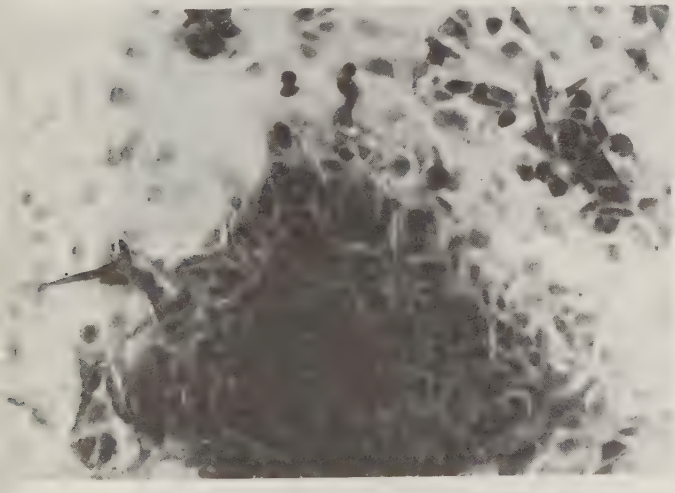


Abb. 7:
Zellen der Larynxkar-zinom-Zellinie HLaC 79 in Kultur.
(Passage 17)
(Vergrößerung 300 mal)

Abb. 8:
Zellen der Parotiskar-zinom-Zellinie $HPaC^{+}$ 79 in Kultur.
(Passage 34)
(Vergrößerung 300 mal)
Phaco

Abb. 9: Bild einer thymusaplastischen (nu/nu) Maus. Der Maus wurden 5 x 10^6 Zellen der Larynxkarzinom-Zellinie HLaC 79 eingeimpft. Darauf entwickelte sich nach einer Woche dieser Tumor.

Abb. 10: Auf der Abbildung (Vergrößerung 480 mal) sieht man einen epithelialen Klon, der von Fibrozyten eingekreist wird.

Abb. 11: Paraffinschnitt einer Metastase eines malignen Melanoms (Vergrößerung 250 mal). Die Zellinie HMe 78 entstammt diesem Tumor.

Abb. 12: Tumor, produziert durch HMe 78 Zellen nach Transplantation in (nu/nu) Mäuse. Die histologische Struktur des Originaltumors wird reproduziert.

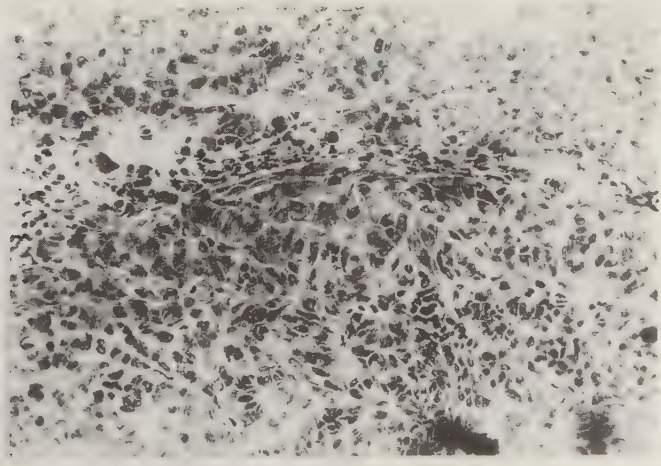


Abb. 13: Paraffinschnitt einer Larynxkarzinom-Metastase (Vergrößerung 250 mal). Die Zellinie HLaC 79 entstammt diesem Tumor.

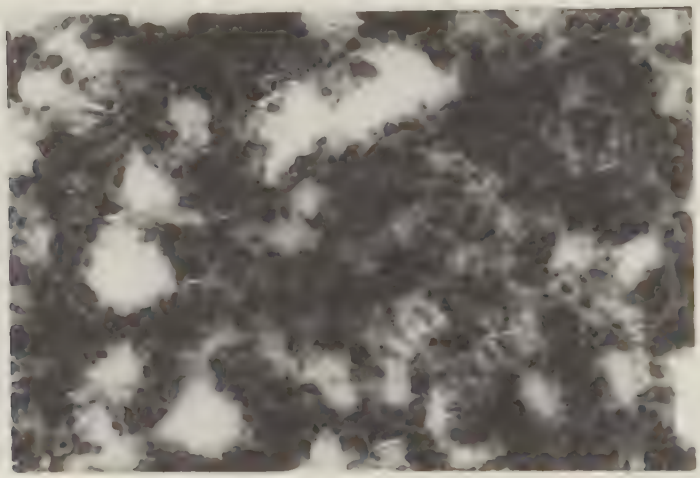


Abb. 14: Tumor, produziert durch HLaC 79 Zellen nach Transplantation in (nu/nu) Mäuse. Die histologische Struktur des Originaltumors wird reproduziert.

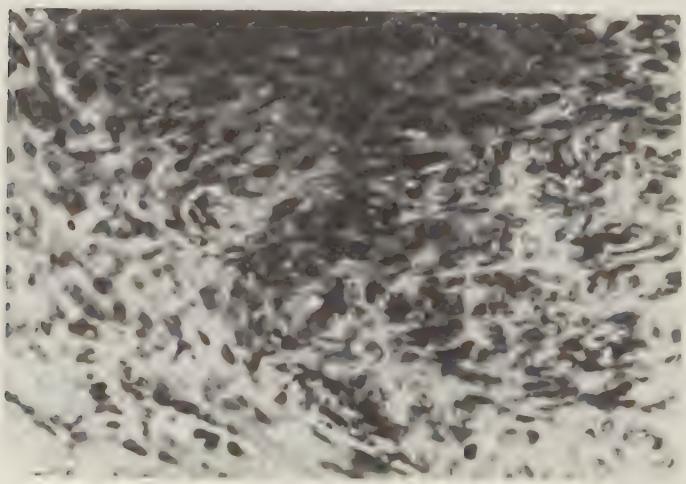


Abb. 15: Paraffinschnitt einer Parotiskarzinom-Metastase (Vergrößerung 250 mal). Die Zellinie $HPaC^{+}$ 79 entstammt diesem Tumor.

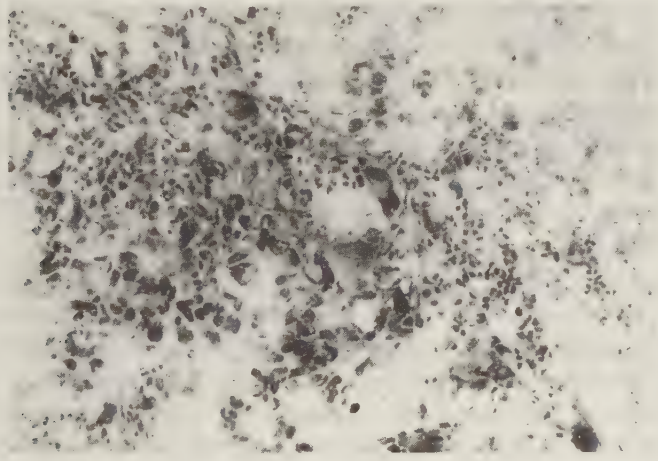
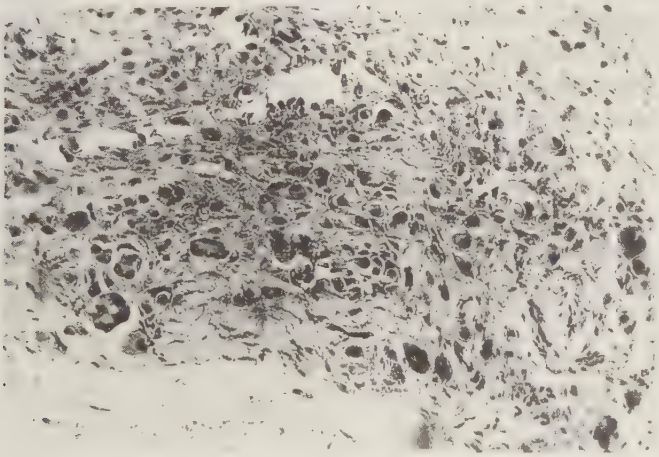


Abb. 16: Tumor, produziert durch $HPaC^{+}$ 79 Zellen, nach Transplantation in (nu/nu) Mäuse. Die histologische Struktur des Originaltumors wird reproduziert.



6 DISKUSSION

In der Literatur wurden erst zwei Dauerkulturen von menschlichen Larynx-Karzinomzellen und drei Dauerkulturen von menschlichen Speicheldrüsen-Karzinomzellen beschrieben. Es sind die Larynx-Karzinomzellinien HEp 2 (27) und CCRF-108 (15), die 1952 und 1956 angezüchtet wurden. Die Speicheldrüsen-Karzinomzellinien werden 558 (8), Nagoya 78 (28) und Casa 1 (43) bezeichnet und wurden 1961, 1966 und 1972 etabliert. Daneben konnten sechzehn Dauerkulturen maligner Melanome des Menschen gewonnen werden (4).
Von diesen Kulturen standen, neben vier Dauerkulturen maligner Melanome, zu Beginn der Arbeit nur noch die Larynxkarzinom-Zellinie HEp 2 (27) zur Verfügung. Diese Linie ist aber mit fremden Zellen kontaminiert (13). So war es notwendig, frische Zellinien zu züchten.

Viele Tiertumoren sind mit Standardmethoden leicht zu züchten (33), die meisten Dauerkulturen menschlicher Malignomzellen werden aber erst nach vielen, erfolglosen Anstrengungen etabliert. Kurzzeitkulturen können leicht angezüchtet werden, diese sterben aber meist nach wenigen Wochen oder Monaten und nur wenige entwickeln sich zu etablierten Zellinien (20). Die Fortschritte unserer Erkenntnisse über das Wachstum, die Ernährung und den Metabolismus der Zellen in vitro haben die Schwierigkeiten beim Anzüchten von menschlichen Dauerkulturen nicht gelöst (36). Es gibt kaum neue Kenntnisse über die Mechanismen, wie Tumorzellen an das Überleben in vitro angepaßt werden können (21).

Dazu schreibt FOGH (4):

"Es gab ein Gefühl starker Frustration unter vielen Forschern, die versucht haben, Zellinien von menschlichen Tumorzellen zu etablieren. Zahlreiche erfolglose Versuche, viele davon wurden nicht publiziert, haben zu dem Schluß geführt, daß die Etablierung von Zellinien von dem seltenen Auftreten eines Tumors mit eingebautem Potential für ein Langzeitwachstum in vitro und von der Anwendung sehr feinfühliger, diffiziler Kulturtechniken abhängt."
"Jedoch ist die Gesamtzahl der Erfolgsversuche nicht wirklich repräsentativ für die Häufigkeit, mit der Linien etabliert werden können. Viele Abweichungen müssen in dieser Hinsicht bedacht werden, einschließlich der Wahl des Materials, der Gewinnungsverfahren, dem Zeitraum zwischen der klinischen Gewinnung und der Präparation für die Zellkultur, technischem Können der Assistenten und zufälligen Faktoren, die jeder kennt, der in der Zellkultur arbeitet. Eine Sache jedoch steht außer Diskussion: die sorgfältige Aufmerksamkeit für alle minuziösen Details, aufgebracht von dem Kulturisten, der sich den Zellen widmet, scheint der wichtigste aller Faktoren zu sein und kann nicht gut ersetzt werden durch besondere Rezepte oder Phantasie."

Die Hauptursache für die kurze Lebensdauer der Primärkulturen dürfte darin liegen, daß das metabolische Milieu der Zellkultur die natürliche Umgebung der Zellen nicht ersetzen kann (34). Das Kulturmedium ist das bei weitem wichtigste Faktorensystem bei der Züchtung von Zellen und Geweben (33). In den letzten 60 Jahren wurden über 100 verschiedene Medien entwickelt (44), aber es gibt kein Medium, in dem regelmäßig Dauerkulturen etabliert werden können (21). Die bisherigen Dauerkulturen wurden unter Verwendung einer Vielzahl von Medien und nach verschiedensten Ansatzmethoden etabliert (21). Mit unseren heutigen Kenntnissen über den Stoffwechsel ist es offenkundig, daß es nie ein universelles Kulturmedium für alle Zelltypen geben wird (33).

Bei den klassischen Gewebekulturmethoden wächst das Gewebe in einem Gerinnsel; Ross HARRISON verwandte bei seinem ersten Experiment Froschlymphe, LARREL (67) führte das Plasmagerinnsel ein, das heute noch in Gebrauch ist. Bereits 1911 begannen Warren und Margaret LEWIS (23) die Faktoren des Kulturmediums zu erforschen, die für das Wachstum und Weiterleben der Zellen notwendig sind. Erst 1954 wurde das erste, rein synthetische Medium entwickelt (Medium Nr. 858), in dem Zellinien ohne die Gabe von Makromolekülen aus biologischen Flüssigkeiten wachsen können (32). Aber erst eine kleine Zahl von Zellinien konnten an rein synthetische Medien adaptiert werden (26) und auch diese Medien enthalten bald Makromoleküle, die aus wachsenden Zellen und/oder toten Zellen stammen (41). Nach PARKER (32) sind diese adaptierten Zellinien keine normalen Zellinien, sondern haben sich angepaßt, in dem synthetischen Medium zu wachsen. So ist die Grundlage der meisten Kulturmedien immer noch biologisches Material, das gebräuchlichste ist Serum. Menschliches Nabelschnurserum und fötales Kälberserum scheinen besonders günstig zu sein (33).

In dieser Arbeit wurden neun verschiedene synthetische Kulturmedien verwandt, die alle mit fötalem Kälberserum (20 ml/100 ml) angereichert waren. Wurde ein Tumor mit verschiedenen Medien angesetzt, so kam es häufig vor, daß nur in einem Medium Zellen auswachsen konnten (Tab. 4). Die besten Ergebnisse lieferte das Medium BME (Earle).

FOGH konnte beweisen, daß die kürzest mögliche Zeit zwischen der Gewinnung und dem Ansetzen des Tumors die beste Voraussetzung bietet, um ein Auswachsen der Tumor-

zellen in vitro zu erreichen (14). Bei dieser Arbeit war es besonders günstig, daß sich die Operationssäle im selben Haus wie das Zellkulturlaboratorium befinden. So konnten die Tumoren sofort nach der Entnahme angesetzt werden.

Zum Anlegen einer Primärkultur benötigt man eine Zellsuspension, die man durch enzymatisches und/oder mechanisches Zerlegen des Tumorgewebes herstellen kann (Kap. 4.6). Bei beiden Verfahren werden die Zellen stark traumatisiert oder vernichtet, gewöhnlich überleben weniger als 0,02 % der Zellen (24); es bleiben aber genügend Zellen zum Auswachsen übrig (16). BAUER (1) empfiehlt das mechanische Zerlegen des Gewebes, denn die Schnittwunde des Explantats ist der Ort, von dem das Wachstum in vitro ausgeht. PAUL (33) bevorzugt das enzymatische Auflösen des Gewebes, insbesondere bei bindegewebsreichen Tumoren.

Bei dieser Arbeit wurde das Gewebe der ersten vier Tumore mechanisch zerlegt sowie mit Trypsin und Kollagenase aufgelöst. Nach mechanischem Zerlegen wie auch nach Auflösen mit Kollagenase wuchsen vier Primärkulturen aus, nach Behandlung mit Trypsin aber nur zwei. Die restlichen Primärkulturen wurden daraufhin nur noch durch mechanisches Zerlegen des Tumorgewebes angelegt.
Nach Anlage einer Primärkultur ist es äußerst wichtig, daß die Kulturschalen mindestens drei Tage nicht bewegt werden, damit die Zellen ungestört auswachsen können. Auch später sind die Primärkulturen bei den notwendigen Manipulationen so schonend wie möglich zu behandeln, sonst degenerieren die Zellen und lösen sich ab.

In einer Primärkultur wachsen eine Vielzahl von Zellen aus, die zum großen Teil noch nicht identifiziert werden konnten (Kap. 4.7). Wichtig sind die Tumorzellen, die man meist an ihrem charakteristischen Wachstum erkennt und die Fibrozyten.

Es gibt viele Untersuchungen über das Mischwachstum von Tumorzellen und Fibrozyten. SANTESSON (39) kultivierte Brusttumoren von Mäusen zusammen mit embryonalen Herzzellen von Mäusen und beobachtete, daß die anaplastischen Tumore invasiv in die normalen Zellklone einwuchsen, während die gutartigen Tumore von den normalen Zellen ummauert und so am weiteren Wachstum gehindert wurden. LEIGHTON (22) meinte, daß die Tumorzellen die Fibrozyten als Kanal benutzen, um in die normale Zellkultur einzudringen.

HENLE und DEINHARDT (19) beschrieben, daß in einigen etablierten Malignomzellinien zuerst nur fibrozytenähnliche Zellen zu sehen waren, und erst nach einigen Passagen Klone epithelialer Zellen erschienen, die schließlich die Fibrozyten überwuchsen. Die Fibrozyten könnten als Ammenzellen gedient haben, bis die Malignomzellen sich soweit vermehrt hatten, daß sie sich allein erhalten konnten.

FOGH (12) beobachtete, daß die Fibrozyten meist schneller wachsen als die Tumorzellen, sie umzingeln und buchstäblich ersticken.

Auch in dieser Arbeit zeigten sich die verschiedenen Möglichkeiten der Beziehungen zwischen Fibrozyten und Tumorzellen (Kap. 5.6).

In 21 Primärkulturen wuchsen Fibrozyten gleichzeitig mit den Epithelzellen aus; es wurde keine Kultur beobach-

tet, in der zunächst allein Epithelzellen auswuchsen.

In zwölf Kulturen umzingelten die Fibrozyten die epithelialen Klone, worauf in elf Kulturen die Epithelzellen degenerierten und abstarben, wenn man die Fibrozyten nicht rechtzeitig entfernte. In einer Kultur wuchsen die eingemauerten Epithelzellen jedoch langsam weiter und drängten die Fibrozyten zurück.

In vier Kulturen wuchsen die Fibrozyten invasiv in die epithelialen Klone ein und zerstörten die Epithelzellen. Epitheliale Klone, die von Fibrozyten infiltriert waren, konnten nicht gerettet werden und starben ab.

In zwei Kulturen wuchsen die Epithelzellen schneller als die Fibrozyten und überwucherten sie.

In den restlichen drei Kulturen starben die Epithelzellen, bevor eine Interaktion mit den Fibrozyten beobachtet werden konnte.

JOACHIM (20) beschreibt, daß es relativ leicht ist, Kurzzeitkulturen epithelialer Zellen zu züchten. Nur die wenigsten Kulturen entwickeln sich aber zu Dauerkulturen, da sich viele Zellen nicht an das metabolische Milieu der Zellkultur adaptieren können.

Auch in dieser Arbeit konnten aus 35 menschlichen Malignomen 21 Primärkulturen epithelialer Zellen angezüchtet werden.

In achtzehn Kulturen wuchsen zum Teil sehr große epitheliale Klone aus (Abb. 2), aber nach einem Zeitraum, der je nach Kultur zwischen vier Tagen und drei Monaten schwankte, stellten sie ihr Wachstum ein (Abb. 1). Die Epithelzellen blieben noch einige Zeit vital, manche bis zu drei Monaten, dann degenerierten sie und lösten sich ab. Versuche, durch Wechseln des Kulturmediums die

Lebensbedingungen der Zellen zu ändern und so ein erneutes Wachstum zu erreichen, hatten keinen Erfolg.

Drei epitheliale Kulturen hatten mitunter Wachstumskrisen, stellten jedoch nie ihr Wachstum ganz ein. Aus ihnen konnten drei Dauerkulturen gewonnen werden. Zwei Dauerkulturen wurden bereits über 70 mal subkultiviert und dürfen deshalb als etablierte Zellinien bezeichnet werden; d. h. sie lassen sich wahrscheinlich in vitro beliebig lange kultivieren. Die dritte Dauerkultur wurde 50 mal subkultiviert und wird weiterhin routinemäßig umgesetzt und kultiviert.

Eine Dauerkultur kann aus mehreren Zellstämmen bestehen. Der beste und sicherste Weg, eine reine Zellinie zu erhalten, ist die Zucht der Linie aus einer einzigen Zelle, d. h. klonieren (Kap. 4.9). Es ist dabei nicht sicher, daß die Nachkommen genetisch homogen bleiben; die Methode gibt nur die Gewähr dafür, daß alle Zellen von demselben Allgemeintyp sind.

Noch 1954 meinte K. BAUER (1), daß eine Einzelzelle nicht lebensfähig ist. "Alle Experimente zum Nachweis der Lebensfähigkeit isolierter Zellen in vitro mit verschiedenen Methoden sind mißlungen, so daß der mögliche Einwand einer durch die künstliche Isolierung bedingten Schädigung ausfällt. " Die Zelle ist also nicht die letzte lebensfähige Einheit, wie der anatomische Lehrsatz lautet."

Inzwischen sind verschiedene Methoden beschrieben worden, mit denen man Zellen klonieren kann (38). Die Einzelzellen werden in möglichst wenig Medium gehalten, damit sich eine zelleigene Mikroumgebung einstellen kann. Man läßt die Zellen in Kapillaren wachsen (Kap. 4.9.2)

oder in den winzigen, schüsselförmigen Vertiefungen von Cuprakschalen (Kap. 4.9.1). Außerdem verwendet man Kulturmedium, in dem bereits Zellen der eigenen Art gewachsen sind ("konditioniertes Medium, Kap. 4.3.1). In einer größeren Kultur helfen sich die Zellen durch den Austausch von Nährstoff- und Wuchsfaktoren gegenseitig. Diese Faktoren sammeln sich im Medium und unterstützen die isolierten Zellen.

Mit diesen Verfahren wurden Zellen kloniert, die schon lange in Kultur waren und sich optimal an die Bedingungen in vitro angepaßt hatten (33). Nun sollten aber Zellinien kloniert werden, die erst kurze Zeit in Kultur wuchsen; Zellen können bei längerer Kultivation entdifferenzieren (7,17), verlieren damit Charakteristika der ursprünglichen Zellen und sind für Versuche nur noch bedingt zu gebrauchen.

Die wenigsten Schwierigkeiten beim Klonieren bereitete die Melanomzellinie. Sie konnte bereits fünf Monate nach Anlage der Kultur und in der 16. Passage mit Hilfe von Cuprakschalen kloniert werden (Kap. 5.7.11).

Dagegen war es nicht möglich, die Larynxkarzinom-Zellinie neun Monate (16. Passage) oder zehn Monate (20. Passage) nach Kulturbeginn zu klonieren. Es wuchsen Einzelzellen an, teilten sich ein- bis zweimal und starben ab. Erst nachdem die Zellen sechzehn Monate in Kultur und 40 mal subkultiviert waren, konnten sie kloniert werden (Kap. 5.7.2.1).

Vierzehn Monate (10. Passage) und 24 Monate (30. Passage) nach dem Auswachsen der Kultur konnten die Parotiskarzinomzellen nicht kloniert werden. Auch diesmal wuchsen viele Einzelzellen an, teilten sich, aber bildeten keinen größeren Klon. Nur wenn sich fünf oder mehr Zellen

absetzten, konnten sie wachsen und sich vermehren. So konnte nur eine "teilklonierte" Kultur gewonnen werden, die sich von fünf Zellen herleitet (5.7.3.1). Da die Parotiskarzinom-Zellinie bereits über zwei Jahre wächst, Fibrozyten aber nie länger als ein Jahr zu kultivieren sind (33) und auch alle anderen Zelltypen nur kurz in vitro wachsen (5), kann man davon ausgehen, daß es sich bei der HPaC $^{+}$79 Kultur um reine Parotiskarzinomzellen handelt. Das wurde auch durch eine Tumorreproduktion in (nu/nu) Mäusen bestätigt, die dem Originaltumor glich (Kap. 5.7.3.2). Es ist aber möglich, daß die Kultur aus verschiedenen Parotiskarzinom-Zellstämmen besteht.
Auch PAUL (33) beschreibt, daß Kolonien aus Einzelzellen bei einigen Zellarten viel leichter wachsen als bei anderen. Das Wachstum hängt aber nicht nur vom Zelltyp ab, sondern es spielt auch eine Rolle, wie lange die Zellen bereits in vitro wachsen. In jungen Kulturen können Einzelzellen anwachsen und sich ein- bis zweimal teilen, sie vermehren sich aber nicht kontinuierlich weiter. Nur wenn mehrere Zellen zusammenliegen, kann eine Zellinie wachsen.

Eines der Hauptprobleme beim Arbeiten mit kultivierten Zellen ist, daß Zellen in vitro mit der Zeit hochspezialisierte Eigenschaften verlieren können, sie entdifferenzieren. Beispiele sind das Verschwinden von Melanin aus Kulturen mit pigmentierten Netzhautzellen oder der Verlust der Chondroitinsulfatsynthese in Knorpelzellkulturen (7,17).

Diese Schwierigkeit kann durch Einfrieren von Vorräten aus Zellen überwunden werden. SMITH (40) entwickelte 1952 eine Technik, mit der man lebende Zellen tieffrieren

und über Jahrzehnte aufbewahren kann (Kap. 4.11).
Deshalb wurden die Zellen der Dauerkulturen nach gelungener Klonierung sofort in großem Maßstab gezüchtet und tiefgefroren. So stehen für Experimente immer Zellen niedriger Passagezahl zur Verfügung, die den ursprünglichen Zellen noch möglichst ähnlich sind.

Bei jeder Zellinie stellt sich das Problem, zu bestimmen, ob die Zellinie aus malignen oder normalen Zellen, aus Bindegewebe oder anderen Elementen besteht.

So wurden von Zellen der klonierten Zellinien HMe 78 und HLaC 79 die Chromosomen analysiert (Kap. 5.8).

In allen Zellen wurden mehr Chromosomen als normal gefunden. Außerdem fanden sich Aberrationen,die auf einen Umbau der Chromosomen schließen lassen. Dies sind typische Merkmale von Tumorzellen (3).
Da aber auch Dauerkulturen von normalem Gewebe ungewöhnliche Chromosomenzahlen haben können, (33), ist das Ergebnis nicht für Tumorzellen beweisend. Vielmehr wird ein sicherer experimenteller Ansatz zum Nachweis der Malignität benötigt.

Hat man durch Klonieren erreicht, daß alle Zellen der Kultur vom selben Allgemeintyp sind, werden die Zellen in Tiere implantiert, damit sie einen Tumor bilden. Reproduziert dieser Tumor die histologischen Strukturen des Originaltumors, so handelt es sich bei den kultivierten Zellen um die Zellen des ursprünglichen Tumors.

Damit die kultivierten Zellen in den Tieren anwachsen können, muß man die Wirtsreaktion unterdrücken. Man kann dazu die Tiere mit Röntgenstrahlen behandeln (29) oder ihnen Cortison applizieren (42). Es gibt auch eine Mausmutante (nu/nu mouse), die infolge eines Gendefektes

eine angeborene Thymusaplasie aufweist. Die dadurch verursachte Schädigung zellulärer Immunabwehr begünstigt ein Anwachsen heterologer Gewebe (25).

In dieser Arbeit wurden Zellen der klonierten Dauerzellinien HLaC 79 und HMe 78 sowie der "teilklonierten" Dauerzellinie HPaC 79 in thymusaplastische (nu/nu) Mäuse geimpft. Die Zellen bildeten nach vier bis vierzehn Tagen Tumore, die histologisch die gleichen, invasiv und destruierend wachsenden Bilder zeigten wie die ursprünglichen Tumore der Patienten (Abb. 11-16). Der Nachweis der Malignität der klonierten Zellinien ist damit erbracht.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb zweier Jahre wurden 35 maligne Tumore aus dem Kopf- und Halsbereich in der Zellkultur angesetzt, damit sie in vitro weiterwachsen.

Das Tumorgewebe wurde von allem nekrotischen und avitalen Material befreit und enzymatisch oder mechanisch zerlegt. Die Gewebsfragmente und suspendierten Zellen wurden in Kulturschalen mit verschiedenen Kulturmedien gegeben und inkubiert. Die erfolgreichste Ansatzmethode war, das Tumorgewebe in einer mit Medium gefüllten Schale durch schnelle, senkrechte Schnitte in dünne Scheibchen zu schneiden. Die gewonnene Zellsuspension mußte auf eine Konzentration von 10^4 Zellen/ml verdünnt werden. Unter den Kulturmedien lieferte das Medium BME (Earle) die besten Ergebnisse.

In 21 Primärkulturen wuchsen Epithelzellen und Fibrozyten aus. Meist vermehrten sich die Fibrozyten schneller als die Epithelzellen. Wurden sie nicht eliminiert oder durch verschiedene Methoden an der Vermehrung gehindert, so eliminierten sie gewöhnlich die Epithelzellen.

In achtzehn Kulturen verschwanden die Epithelzellen nach einer Lebensdauer, die je nach Kultur zwischen zwei Wochen und sechs Monaten betrug. Diese Kulturen konnten bis zu viermal subkultiviert werden.

Drei epitheliale Kulturen (eine Larynxkarzinom-Kultur, eine Parotiskarzinom-Kultur und eine Melanom-Kultur) haben die Fähigkeit entwickelt, in vitro scheinbar unbe-

grenzt weiterzuwachsen. Nachdem die Zellen sich erst langsam vermehrt hatten, kam es nach einer Wachstumskrise zu einem konstant raschen Wachstum.

Die Melanom-Zellinie und die Larynxkarzinom-Zellinie konnten kloniert werden. Es wurde von jeder Zellinie eine Einzelzelle isoliert und zu Wachstum und Vermehrung überführt. Die klonierten Zellinien wurden HMe 78(Humanes Melanom 1978) und HLaC 79 (Humanes Larynx Carcinom 1979) genannt.

Die Parotiskarzinom-Zellinie konnte bisher nicht kloniert werden. Es wuchsen Einzelzellen an, teilten sich aber höchstens ein- bis zweimal und starben ab. Es konnte nur eine "teilklonierte" Zellinie gewonnen werden, die von fünf Zellen abstammt. Sie wurde $HPaC^{+}$ 79 (Humanes Parotiskarzinom 1979) genannt.

Die Zellen der drei Zellinien wurden in thymusaplastische (nu/nu) Mäuse geimpft und somit der Beweis erbracht, daß es sich bei den kultivierten Zellen um die Zellen des ursprünglichen Tumors handelt. Die Zellen erzeugten in den (nu/nu) Mäusen maligne Tumore, die histologisch mit den Originaltumoren übereinstimmten.

Alle Zellinien wurden bis zum heutigen Zeitpunkt routinemäßig umgesetzt und erreichten die 75. Passage (HLaC 79), die 72. Passage (HMe 78) und die 50. Passage ($HPaC^{+}$ 79).

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bauer, K., 1954, Methodik der Gewebezüchtung. Hirzel Verlag, Stuttgart.

2. Beebe, S. P., 1906, A study of the biology of tumor cells. Brit. med. J. 2. 1559.

3. Biedler, June L., Chromosome Abnormalities in Human Tumor Cells in Culture. In: Human Tumor Cells in Vitro. Fogh, J., (ed.) pp. 359-389, N.Y. Plenum Press 1975.

4. Bremer, W., H. P. Zenner, I. F. Hermann, 1980, Enzymhistochemische Möglichkeiten der Unterscheidung von kultivierten Tumorzellen und Fibrozyten. Vortrag in Würzburg.

5. Cailleau, R. M., Old and New Problems in Human Tumor Cell Cultivation. In: Human Tumor Cells in Vitro. Fogh, J., (ed.) pp. 79-108, N.Y. Plenum Press 1975

6. Carrel, A., 1912, The permanent life of tissue outside of the organism. J. exp. Med. 15, 516.

7. Coon, H. C., 1966, Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilago cells in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 55, 66.

8. Dobrynin, J. J., 1963, The cell line 558. Natl. Cancer Inst. 31: 1173.

9. Eagle, H., 1959, Amino acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. Science 130, 432.

10. Eagle, H., 1955, The Cultivation of the Tumor Cell Line KB. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89: 362.

11. Flanagen, S. P., 1966, "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the nude mouse. Genet. Res. 8. 295-309.

12. Fogh, J., 1975, Human Tumor Cells in Vitro, N. Y., Plenum Press.

13. Fogh, J., 1980, Vortrag in Würzburg.

14. Fogh, J., 1975 , Einführung in: Human Tumor Cells in Vitro. N.Y. Plenum Press.

15. Foley, G., 1960, The Cell Line CCRF 108, Cancer Res. 20: 930.

16. Foley, J. F., 1965, Growth of human breast neoplasms in cell culture. Natl. Cancer Inst. 34: 217.

17. Green, H., 1963, Kinetics of collagen syntesis by established mammalian cell lines. Nature (Lond.) 200, 1097.

18. Harrison, R. G., 1907, Observations on the living, developing nerve fiber. Proc. Soc. exp. Biol.(N.Y.)4, 140.

19. Henle, G., Deinhard, F., 1957, The establishment of strains of human cells in tissue culture. J. Immunol. 79: 54.

20. Joachim, H. L., 1970, Tissue culture of human tumors: Its use and prospects. Pathol. Ann. 5: 217.

21. Leibovitz, A., Development of media for isolation and cultivation of human cancer cells. In: Human Cancer Cells in Vitro. Fogh, J., (ed.) pp. 23-44, N.Y., Plenum Press 1975.

22. Leighton, J., 1957, Contributions of tissue culture studies to the understanding of the biology of cancer: A review, Cancer Res. 17: 929.

23. Lewis, M., 1911, The cultivation of tissue from chick embryos in solutions of NaCl, $CaCl_2$, KCl, and $NaHCO_3$. Anat. Rec. 5: 277.

24. Mc Limans, W. F., 1966, A controlled environment system for study of mammalian cell physiology. Ann. N.Y., Acad. Sci. 139: 190.

25. Lindenberger, J., 1978, Die Heterotransplantation bösartiger Kopf und Halsgeschwüre auf thymusaplastische nackte Mäuse. Arch. Oto-Rhino-Laryng. 220, 117-128.

26. Ling, C. T., 1968, Chemically characterized concentrated corodies for continuous cell culture. Exp. Cell. Res. 52: 469.

27. Moore, A., 1955, The cell line Hep -2. Cancer Res. 15: 598.

28. Muragishi, H., 1969, The cell line Nagoya-78. Nagoya Jagaku (J. Nagoya Med. Assoc.) 92: 373.

29. Murphy, J. B., 1913, Transplantability of tissues to the embryo of foreign species. J. exp. Med. 17: 482.

30. Nossal, G. J. V., Antibody production in tissue culture. In: E. M. Willmer (ed.), Cells and tissues in culture. Academic Press, N.Y. (1966) Vol. 3, s. 317.

31. Pantelouris, E. M., 1968, Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 217, 370-371.

32. Parker, R. C., 1954, Nutrition of animal cells in tissue culture 7. Use of replicate cell culture in the evaluation of synthetic media. Canad. J. Biochem. 32: 306.

33. Paul, J., 1980, Zell- und Gewebekulturen. Walter de Gruyter, Berlin, N.Y.

34. Mc Quilcins, W. T., 1957, The adaption of additional lines of NCTC Clone 929 (Strain L) cells to chemically defined protein free medium NCTC 109. J. Nat. Cancer Inst. 19: 885.

35. Romeis, 1976, Histologische Technik, Hirzel Verlag, Stuttgart.

36. Rothblat, G. H., in Cristofalo, V. J. (Hrsg.) Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture. Vols 1 and 2, Acad. Press, N.Y. 1967.

37. Roux, W., 1885, Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryos. 2. Biol. 21: 441.

38. Sanford, K., 1961, Cloning of mammalian cells by a simplified capillary technique. Exp. Cell. Res. 23, 361-372

39. Santesson, L., 1935, Characteristics of epithelian mouse tumore cells in vitro and tumor structures in vivo: A comparative study. Acta Patho. Microbiol. Scand. Suppl. 24: 1.

40. Smith, A. U., 1952, Cultivation of ovarian granulosa cells after cooling to very low temperatures. Exp. Cell. Res. 3: 574.

41. Temin, H. M., 1972, The role of serum in the multiplication of mammalian cells. In: Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture. Rothblath (ed.), pp. 49-81, Acad. Press N.Y.

42. Toolan, H. W., 1954, Transplantable human neoplasms maintained in cortisone treated laboratory animals. Cancer Res. 14: 660.

43. Trempe, G., New Human Tumor Cell Lines. In: Human Cancer Cells in Vitro. Fogh, J., (ed.), pp. 115-154. N.Y., Plenum Press 1975.

44. Waymouth, Ch., 1965, Synthetic Media in Relation to Cells and their Total Environment. In: Cells and Tissues in Culture. Willmer, E. N. (ed.), Acad. Press N.Y. 1: 121.

45. Zenner, H. P., W. Lehner, I. F. Hermann, 1979, Establishment of Carcinoma Cell Lines from Larynx and Submandibular Gland. Arch. Otorhinolaryngol. 225, 269-277.

46. Zenner, H. P., I. F. Herrmann, 1979, Tumorantigene induzieren humorale und zelluläre Immunantworten bei Larynxkarzinomen. Laryng. Rhinol. 58, 865-870.

47. Zenner, H. P., I. F. Herrmann, 1978, Proteinmuster der Zellmembranen von malignen Larynx-, Pharynx- und Parotiszellen. Arch. Otorhinolaryngol. (N.Y.) 219, 483.

Dem Referenten

Herrn Professor Dr. med. I. F. Herrmann

danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas sowie für die jederzeit freundliche und hilfreiche Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Dem Direktor der Klinik,

Herrn Professor Dr. med. W. Kley

danke ich für die Übernahme des Korreferates und die Erlaubnis, an seiner Klinik arbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Dr. med. habil. P. Zenner.

Er hatte die unmittelbare Aufsicht über meine Promotion übernommen und mich in allen Phasen der Arbeit bereitwillig unterstützt und beraten.

Weiterhin danke ich Frau Ursula Schmitt, Frau Ingrid Klier und Frau Petra Grünsfelder für ihre technische Assistenz.

LEBENSLAUF

Am 5. März 1955 wurde ich als zweites Kind des Diplom-Ingenieurs Gerhard Stremlau und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Ripperger, in Würzburg geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Versbach und wechselte 1965 in das Röntgen-Gymnasium nach Würzburg. Hier legte ich 1974 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg das Studium der Medizin und bestand dort am 24. April 1981 das Medizinische Staatsexamen.

Seit 7. September 1981 leiste ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr ab. Ich bin als Stabsarzt an der Artillerieschule in Idar Oberstein stationiert.

Armin Stremlau

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80